



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Fernandes das Neves

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Isabel Folhas e do Dr. Rui Rodrigues e Monografia intitulada “As Novas Abordagens Terapêuticas de RNA: Circular RNA, Self-amplifying RNA e Trans-amplifying RNA” sob a orientação do Professor Doutor João Nuno Moreira referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Fernandes das Neves

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Isabel Folhas e do Dr. Rui Rodrigues e Monografia intitulada “As Novas Abordagens Terapêuticas de RNA: *Circular RNA*, *Self-amplifying RNA* e *Trans-amplifying RNA*” sob a orientação do Professor Doutor João Nuno Moreira referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

O trabalho de revisão bibliográfica – “As Novas Abordagens Terapêuticas de RNA: *Circular RNA*, *Self-amplifying RNA* e *Trans-amplifying RNA* - O Futuro da Nanobiotecnologia” - teve o apoio do projeto CInTech - *Technological Hub for Innovation, Translation and Industrialization of Complex Injectable Drugs* -, com a referência n.º C644865576-00000005, co-financiado pela Componente C5 - Capitalização e Inovação Empresarial integrada na Dimensão Resiliência do Plano de Recuperação e Resiliência (PRR), através do fundo NextGenerationEU.



REPÚBLICA
PORTUGUESA



Financiado pela
União Europeia
NextGenerationEU

Setembro 2023

Eu, Beatriz Fernandes das Neves, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2018273583, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia Intitulada “As Novas Abordagens Terapêuticas de RNA: *Circular RNA*, *Self-amplifying RNA* e *Trans-amplifying RNA*” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de setembro de 2023

Beatriz Fernandes das Neves

(Beatriz Fernandes das Neves)

AGRADECIMENTOS

A Coimbra, por ser uma cidade tão única e deter um brilho tão especial.

À Faculdade de Farmácia e a todo o corpo docente, que de uma forma tão fulcral me formou e ensinou tudo para ser uma farmacêutica excecional e ter um futuro brilhante.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, pelo docente exemplar que me inspirou a seguir este percurso desde a sua primeira aula, pela sua sensatez e conhecimento, e por todo o apoio e confiança que depositou em mim para a elaboração desta monografia.

À Farmácia Isabel Folhas pelo carinho, amizade e apoio prestado diariamente. A toda a equipa que me fez apaixonar por farmácia comunitária. À Doutora Isabel Folhas por todos os conselhos e ensinamentos que me deu, e que irei levar certamente para a minha carreira profissional.

À AbbVie pela amizade, apoio e espírito de equipa que demonstraram desde o primeiro dia. Obrigada por me darem a oportunidade de fazer parte da vossa equipa de ouro, um dos aspetos mais importantes para o sucesso profissional.

À Maria por me acompanhar durante todo o meu percurso académico. Tem sido uma enorme aventura, a ultrapassar os maiores desafios juntas e a celebrar as conquistas e sucesso de ambas.

À Maria Jorge, à Carolina, à Lena, à Isa, à Marta, à Leonor, à Luisinha, às Brunas, às Joanas, à Bia, a todas vocês que fizeram destes 5 anos os melhores anos da minha vida. A todas as noitadas de estudo, ajudas constantes e companheirismo que sempre tivemos.

Ao Francisco, ao David, ao Rafael, ao Miguel e ao Adri que tornaram este percurso mais leve e divertido, e por estarem sempre lá, mesmo que indiretamente.

À minha madrinha, Pati, por todos os ensinamentos, apontamentos e conselhos que me deste ao longo destes 5 anos. A faculdade tornou-se mais fácil a partir do momento que soube que teria sempre o teu apoio.

À minha caloirinha, Sara, por seres tão especial e por confiares tanto em mim desde o primeiro dia.

À Sofia, à Camila, às Ana, e a todos os meus amigos de sempre, que mesmo longe foram um apoio constante e me ensinaram a conciliar os momentos de estudo e os de diversão.

À minha família, à minha mãe, às minhas avós, ao Vítor, aos meus padrinhos, pelo apoio constante e fundamental, pelo orgulho que sempre tiveram no meu percurso académico e por tudo o que fizeram ao longo de todo o meu crescimento, o que fez de mim a pessoa que sou hoje.

Ao meu irmão, que esteve sempre presente e me inspira diariamente para ser uma farmacêutica de excelência, assim como uma pessoa extraordinária.

Por fim, o maior agradecimento ao meu pai, que sempre me inspirou e me ensinou a ser persistente, exigente, lutadora e me motivou diariamente para que todo o trabalho ao longo destes anos fosse espelho do meu empenho e dedicação. Serás para sempre a minha inspiração e o maior motivo para lutar para que um dia, as palavras escritas ao longo desta monografia, sejam uma realidade para todos os doentes oncológicos.

A todos, o meu mais sincero obrigada!

PARTE I

Relatório de Estágio de Farmácia Comunitária

PARTE II

Relatório de Estágio de Indústria Farmacêutica

PARTE III

Monografia

“As Novas Abordagens Terapêuticas de RNA:
Circular RNA, Self-amplifying RNA e Trans-amplifying RNA”

ÍNDICE

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE FARMÁCIA COMUNITÁRIA

LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. ANÁLISE SWOT	10
2.1. PONTOS FORTES	10
2.1.1. <i>Localização e Inclusão da Farmácia na Comunidade Local</i>	10
2.1.2. <i>Equipa Técnica – Integração, Acompanhamento e Formação Contínua</i>	11
2.1.3. <i>Diversidade das Funções Desempenhadas</i>	12
2.1.4. <i>Autonomia e Responsabilidade</i>	15
2.2. PONTOS FRACOS.....	15
2.2.1. <i>Descredibilização Sentida por Parte dos Utentes</i>	15
2.2.2. <i>Plano de Estudos do MICF</i>	16
2.2.3. <i>Determinação de Parâmetros Bioquímicos</i>	16
2.2.4. <i>Carreira Profissional</i>	16
2.3. OPORTUNIDADES	17
2.3.1. <i>Inovação Tecnológica dos Equipamentos e Serviços Prestados</i>	17
2.3.2. <i>Diversificação do Acompanhamento Farmacoterapêutico Prestado ao Utente</i>	17
2.3.3. <i>Dermocosmética e Suplementos Alimentares</i>	18
2.3.4. <i>Formação Contínua</i>	18
2.4. AMEAÇAS	19
2.4.1. <i>Sazonalidade do Período de Estágio</i>	19
2.4.2. <i>Medicamentos Esgotados e Aparecimento de Novas Indicações Terapêuticas</i>	19
2.4.3. <i>Locais de Venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM)</i>	20
2.4.4. <i>Impossibilidade na Dispensa de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) para Situações Minor</i>	21
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
5. ANEXOS	25
5.1. ANEXO I - CASOS PRÁTICOS	25
5.1.1 <i>Caso Prático 1: Dor de Garganta e Tosse com Expetoração</i>	25
5.1.2. <i>Caso Prático 2: Sarna</i>	26
5.1.3. <i>Caso Prático 3: Higiene Oral</i>	26
5.1.4. <i>Caso Prático 4: Kit de viagem</i>	27
5.1.5. <i>Caso Prático 5: Dermocosmética</i>	29
5.2. ANEXO 2 - FICHA DE PREPARAÇÃO DO MEDICAMENTO MANIPULADO	30
5.3. ANEXO 3 – CÁLCULO DO PREÇO DO MEDICAMENTO MANIPULADO	36

PARTE II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

LISTA DE ABREVIATURAS	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. ABBVIE	39
3. ONCOLOGIA NA ABBVIE – UMA ÁREA DE ENORME POTENCIAL E ASCENSÃO FUTURA	40
4. ANÁLISE SWOT	41
4.1. PONTOS FORTES	41
4.1.1 <i>Equipa Multidisciplinar – Integração, Acompanhamento e Formação Contínua</i>	41
4.1.2 <i>Planeamento do Estágio</i>	42
4.1.3 <i>Inductions</i>	42
4.1.4 <i>Diversidade das Funções Desempenhadas</i>	43
4.1.5 <i>Autonomia e Responsabilidade</i>	44
4.2. PONTOS FRACOS	44
4.2.1 <i>Conhecimento das Várias Áreas do Medicamento e Possíveis Carreiras</i>	44
4.2.2 <i>Plano de Estudos do MICF</i>	44
4.3. OPORTUNIDADES	45
4.3.1 <i>Importância da Realização do Estágio na Indústria Farmacêutica</i>	45
4.3.2 <i>Oncologia - Uma Área Crescente e Repleta de Oportunidades</i>	45
4.3.3 <i>Medicamento Venclyxto®</i>	46
4.3.4 <i>Um dia como Delegado de Informação Médica</i>	46
4.4. AMEAÇAS	46
4.4.1 <i>Duração do Período de Estágio</i>	46
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

PARTE III – MONOGRAFIA

LISTA DE ABREVIATURAS	51
RESUMO	54
ABSTRACT	55
1. INTRODUÇÃO	56
2. TERAPIAS COM RNA – O PANORAMA ATUAL	57
2.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIIS E MECANISMO DE ENTREGA DO MRNA	58
2.2. O TRATAMENTO DE DOENÇAS ONCOLÓGICAS COM A UTILIZAÇÃO DO MRNA	59
2.3. DIFICULDADES E LIMITAÇÕES NA UTILIZAÇÃO DO MRNA	62
3. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS COM RNA	63
3.1. DIFERENÇAS ESTRUTURAIIS E MECANISMOS DE AÇÃO DAS NOVAS CLASSES DE RNA	64

3.1.1. Circular RNA (circRNA)	64
3.1.2. Self-amplifying RNA (saRNA).....	67
3.1.3. Trans-amplifying RNA (taRNA).....	69
3.2. LIMITAÇÕES E MELHORIAS DAS NOVAS TERAPIAS DE RNA.....	70
4. APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA NA ENTREGA DAS NOVAS TERAPIAS DE RNA	72
4.1. UTILIZAÇÃO DE NANOSISTEMAS NA ENCAPSULAÇÃO DE RNA.....	73
4.1.1. Classes de RNA Desprovidas de Veículo	73
4.1.2. Nanopartículas de Origem Polimérica	74
4.1.3. Nanopartículas de Origem Lipídica	75
4.1.3.1. Lípidos Catiônicos.....	76
4.1.3.2. Lípidos Ionizáveis.....	77
4.1.3.3. Componentes Lipídicos.....	77
4.1.4. Nanopartículas Inorgânicas	79
4.2. MECANISMO DE ENTREGA DAS NOVAS TERAPIAS DE RNA	80
4.3. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO PARA A ENTREGA DAS NOVAS TERAPIAS DE RNA	81
5. APLICAÇÃO DAS NOVAS TERAPIAS DE RNA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS ONCOLÓGICAS	82
5.1. APLICAÇÃO DO CIRC RNA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS ONCOLÓGICAS.....	82
5.2. APLICAÇÃO DO SARNNA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS ONCOLÓGICAS.....	85
5.3. PANORAMA ATUAL NO MUNDO DA INVESTIGAÇÃO: ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS	86
6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

PARTE I

Relatório de Estágio de Farmácia Comunitária

Farmácia Isabel Folhas

Estágio Orientado pela Dra. Isabel Maria Fresco Costa Folhas

LISTA DE ABREVIATURAS

Cimpi - Centro de Informação do Medicamento de Preparação Individualizada

FC - Farmácia Comunitária

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FIF - Farmácia Isabel Folhas

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

OF - Ordem dos Farmacêuticos

OMS - Organização Mundial de Saúde

P.V.F. - Preço de Venda à Farmácia

P.V.P. - Preço de Venda ao Público

SNS - Serviço Nacional de Saúde

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*

I. INTRODUÇÃO

A atividade farmacêutica tem tido uma constante evolução ao longo dos tempos. No século XV, a atividade do farmacêutico comunitário regia-se à preparação oficial de medicamentos ou de substâncias medicamentosas. Ao longo dos anos, a profissão evoluiu, sendo que nos dias de hoje, são inúmeras as funções desempenhadas pelo farmacêutico comunitário. Desde 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) descreve os farmacêuticos como “os profissionais de saúde mais acessíveis ao público.”¹, sendo que a importância da profissão tem tido um crescimento exponencial. O farmacêutico desempenha um papel bastante interventivo e crucial na sociedade, sendo que é bastante ampla a quantidade de funções que o mesmo desempenha, desde o acompanhamento farmacoterapêutico do utente, à prestação de cuidados de saúde primários de forma a garantir o máximo de qualidade, eficácia e segurança, até à administração de medicamentos e determinação de parâmetros bioquímicos².

São inúmeras as saídas profissionais que um farmacêutico pode escolher, no entanto, segundo a Ordem dos Farmacêuticos (OF), o farmacêutico comunitário é “a face mais visível da profissão”². Para além do farmacêutico ter uma posição aliada ao Serviço Nacional de Saúde (SNS), tem uma posição ativista na promoção da utilização responsável do medicamento, assim como na adoção de estilos de vida mais saudáveis³. Desta forma, e nos dias de hoje, o papel do farmacêutico abrange muitas outras atividades para além da dispensa de medicamentos, sendo que constitui um pilar fundamental para o total funcionamento do sistema de saúde⁴.

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é organizado em 5 anos, sendo que a última etapa do plano de estudos consiste na realização de um estágio curricular em Farmácia Comunitária. Este estágio é um elo de ligação da componente teórica lecionada ao longo destes 5 anos, com a componente prática que na atividade farmacêutica é tão preponderante. Desta forma, o estágio revela ser uma forma importantíssima para consolidar todos os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, assim como uma excelente oportunidade para adquirir novos conhecimentos.

O presente relatório pretende descrever o Estágio Curricular em Farmácia Comunitária que tive a enorme honra de realizar na Farmácia Isabel Folhas (FIF), em Coimbra, sob atenta orientação da Dra. Isabel Maria Fresco Costa Folhas, Diretora Técnica da mesma. O estágio teve início dia 9 de janeiro de 2023 e término dia 21 de abril de 2023, tendo uma duração total de 672 horas.

2. ANÁLISE SWOT

No presente relatório, irei realizar uma reflexão crítica sobre o meu estágio na FIF, expondo os conhecimentos que adquiri, as atividades que realizei e as observações que considero pertinentes. Desta forma, e tal como preconizado nas “Normas Orientadoras de Estágio do MICF”, irei realizar uma análise *SWOT*, acrónimo das palavras *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*. Estes quatro parâmetros têm como objetivo ajudar-me a fazer uma avaliação pessoal dos fatores internos e externos que caracterizaram e influenciaram o meu estágio. Desta forma, esta análise irá contemplar pontos fortes e pontos fracos (fatores internos) desta fase para a minha formação, assim como irá destacar os pontos que considero oportunidades e ameaças (fatores externos) para o meu desempenho.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Localização e Inclusão da Farmácia na Comunidade Local

A FIF encontra-se localizada na Rua Carolina Michaelis, na Sólum, no coração da cidade de Coimbra. Esta é considerada uma zona bastante diversificada, pois para além de ser uma zona residencial, é também uma zona onde se localizam também várias Escolas Secundárias e o Instituto Politécnico de Coimbra, assim como vários locais de comércio e lazer. Desta forma, a localização da FIF coloca esta farmácia num local de destaque e estrategicamente bem posicionada face ao utente, sendo que a heterogeneidade de utentes e a sua elevada afluência devem-se ao facto de que ao seu redor se localizarem vários estabelecimentos públicos com uma elevada percentagem populacional, assim como pelo facto de ser uma zona residencial bastante acolhedora e agradável. Perante esta localização de excelência, foi bastante notório que ao longo do meu estágio curricular consegui contactar com utentes de várias classes etárias (de jovens a idosos) e com vários graus de literacia, permitindo realizar atendimentos bastante diversificados e personalizados. Aleado a um serviço de saúde pública de excelência que procurei executar, considero que este foi um dos pontos fortes do meu estágio curricular, na medida que cada dia foi uma constante aprendizagem profissional, intelectual e não menos importante, pessoal, uma vez que o contacto direto com o público nos ensina muito sobre o comportamento humano e apela a muitos sentimentos interpessoais, como a compreensão, a responsabilidade e preocupação pelo próximo.

Estando a FIF localizada no coração da cidade de Coimbra e numa zona mais residencial, e apesar da heterogeneidade de faixas etárias que a farmácia recebe diariamente, a população que frequente regularmente a farmácia é de certa forma bastante homogénea, uma vez que a FIF prima pela proximidade e ligação com a população envolvente. Esta característica ímpar

torna o atendimento muito mais próximo do utente, o que me permitiu criar uma ligação mais próxima com o mesmo, o que na minha ótica é bastante importante para o utente, uma vez que este se sente mais familiarizado e acompanhado frequentemente, mas também para o farmacêutico, permitindo ao mesmo desempenhar um atendimento mais personalizado.

Sendo a Solum uma zona de elevada percentagem populacional, localizam-se também várias outras farmácias nesta zona, o que poderia ter sido um obstáculo para a realização do meu estágio curricular. No entanto, este fator não foi de todo um fator negativo, uma vez que o serviço de excelência prestado na FIF, assim como o seu espírito distinto e único, que também me foi inculcado, permitem a fidelização de um enorme número de utentes na mesma, sendo que a concorrência que existe nesta zona não é tão notória.

2.1.2. Equipa Técnica – Integração, Acompanhamento e Formação Contínua

Um dos pontos fortes que destaco no meu estágio de Farmácia Comunitária (FC), é, sem dúvida, a equipa técnica, uma vez que a mesma se mostrou totalmente disponível e prestável, desde o primeiro dia do meu estágio.

A equipa da FIF é composta por nove pessoas, sendo que cada um dos elementos colaborou sempre no meu processo de aprendizagem, ajudando-me a aplicar os conhecimentos adquiridos durante os 5 anos de formação teórica e a superar todas as dificuldades sentidas diariamente. A FIF tem uma organização de excelência, estando cada elemento encarregue de inúmeras tarefas bem distintas que culminam na maximização das potencialidades de cada um, de forma a atingir-se uma maior rentabilidade de cada função inerente à FC. Desta forma, todas as dúvidas que senti no meu dia-a-dia eram facilmente esclarecidas, uma vez que sabia a que profissional me dirigir de acordo com as minhas dúvidas e necessidades.

Sendo uma equipa bastante completa e experiente, senti-me acompanhada desde o primeiro dia, para que rapidamente me tornasse confiante e autónoma. Nas primeiras semanas comecei a desempenhar tarefas de BackOffice, um período bastante importante no meu estágio para me sentir mais contextualizada e integrada, tanto relativamente à equipa, como relativamente às funções que teria de desempenhar num futuro próximo. Quando cumpri os objetivos propostos no BackOffice, passei a ser acompanhada por um dos farmacêuticos no atendimento ao balcão. Este foi um acompanhamento excecional, que me permitiu aprender tudo sobre o programa SIFARMA[®] e ter um primeiro contacto com o público, sendo este contacto introduzido de forma mais indireta e mais confortável para mim como estagiária, permitindo-me aproximar dos utentes de forma gradual. Passadas algumas semanas, comecei

a atender ao público, e foi neste momento onde senti mais o apoio extraordinário por todos os elementos da equipa, tanto por toda a disponibilidade prestada que senti sempre que tinha alguma dúvida, como também por toda a sabedoria que fizeram questão de me transmitir para que conseguisse prestar um serviço de excelência. Enquanto futura profissional de saúde, a equipa da FIF contribuiu, sem dúvida alguma, para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, incentivando-me a ser autónoma, responsável e ensinando-me diariamente a prestar um serviço de extrema qualidade e a consolidar os meus conhecimentos previamente adquiridos. Desta forma, e em jeito de concluir este tópico, tenho de agradecer a todos os colaboradores da FIF por todo o acompanhamento que me deram ao longo dos 4 meses do meu estágio, tornando-me numa profissional de saúde melhor.

2.1.3. Diversidade das Funções Desempenhadas

Outro ponto forte que destaco no meu estágio é, sem dúvida, a diversidade de tarefas que pude desempenhar. A FIF está habituada a receber estagiários já há vários anos, pelo que já existe um plano definido que nos permite executar as várias tarefas de forma cronológica.

Tendo em conta que o trabalho de um farmacêutico comunitário não se prende apenas ao atendimento ao público, realizei outras tarefas prestadas pelo farmacêutico, como o Armazenamento e Receção de Encomendas, Serviços Farmacêuticos de Promoção de Saúde, Preparação de Medicamentos Manipulados e por fim Dinamização do Espaço e Participação em Formações, que de seguida irei abordar detalhadamente.

- Armazenamento e Receção de Encomendas: Nas primeiras semanas do meu estágio, a função que desempenhei prendeu-se com a receção e posterior armazenamento de encomendas. Desta forma, pude começar a familiarizar-me com os vários medicamentos, marcas, associar os nomes comerciais aos princípios ativos e recordar as indicações e dosagens dos mesmos. Nesta fase, pude contactar e gerir encomendas diárias, geridas pelo SIFARMA[®], onde tive a oportunidade de compreender a gestão de stocks, a diferença entre o Preço de Venda à Farmácia (P.V.F.) e o Preço de Venda ao Público (P.V.P.), a problemática dos medicamentos esgotados e a gestão das diferentes distribuidoras farmacêuticas nacionais. Este foi um período fulcral, pois compreendi o impacto que uma boa gestão de encomendas pode ter no funcionamento da farmácia, uma vez que os stocks devem ser compatíveis com as necessidades dos utentes da farmácia, de forma a que os mesmos se sintam continuamente satisfeitos. De seguida, procedia ao armazenamento dos produtos, sendo esta uma etapa importantíssima para a rapidez do atendimento e para a gestão de stocks. Desta forma, os produtos eram organizados de acordo com a

sua procura e validade, de modo a serem facilmente localizados e de forma a escoar primeiro os produtos com um prazo de validade mais curto. Todo este processo é bastante facilitado na FIF devido à aquisição de um *robot*, que pelas suas dimensões, armazena praticamente todos os Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) e alguns dos Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), sendo o excedente exposto nos lineares ao longo da farmácia, assim como arrumado por categorias no armazém. Desta forma, a minha função passou por colocar os MSRM e alguns dos MNSRM no *robot* e arrumar os restantes nos devidos locais destinados aos mesmos.

- Serviços Farmacêuticos de Promoção de Saúde: A FIF presta variados serviços farmacêuticos, desde consultas de nutrição e podologia, até à medição de peso e tensão arterial. Nestes momentos, tive oportunidade de praticar a técnica de medição de tensão arterial, assim como também contribui para a consciencialização da importância de uma mudança de estilo de vida através de melhores hábitos alimentares e prática de exercício físico. Estes eram momentos que me aproximaram bastante aos utentes, uma vez que se executam num espaço privado dedicado ao utente, mas também me permitiram melhorar as minhas técnicas de comunicação. Por fim, o meu sentido de alerta foi também desenvolvido para detetar valores mais alterados, muitas vezes provocados pela não aplicação de medidas não farmacológicas e não adesão à terapêutica.
- Atendimento ao Público: O atendimento ao público foi, sem dúvida, a tarefa que mais realizei, revelando ser a tarefa mais desafiadora e exigente durante o meu estágio. Desde cedo, a observação do atendimento foi bastante incentivada, uma vez que este é o momento em que me comecei a familiarizar com o módulo de atendimento do SIFARMA[®], com o discurso que deveria ter com os utentes durante o ato do aconselhamento farmacêutico, assim como com a interpretação de receitas médicas manuais. Posteriormente, comecei a fazer os atendimentos acompanhada e só mais tarde executei esta tarefa totalmente sozinha, tendo sido um percurso bastante natural e sabendo que poderia sempre abordar qualquer membro da equipa para solicitar ajuda. Nesta fase, compreendi a importância de manter o espírito crítico aquando da análise de uma receita médica, percebi a necessidade de explicar a importância da adesão à terapêutica, assim como de alertar para a importância de cumprir com as indicações prestadas pelo médico e pelo farmacêutico para que o medicamento possa ter o seu devido efeito terapêutico. Existem certos medicamentos onde estes pontos são bastante notórios, como é o caso da dispensa de um antibiótico, onde a mesma deve ser acompanhada por um alerta sobre o facto da necessidade de tomar o antibiótico sempre às mesmas horas e até ao fim da embalagem. Para além destes pontos, consegui perceber

a enorme frequência na procura de medicamentos de certos grupos farmacológicos e na importância que existe em alertar o utente para os cuidados especiais que deve ter aquando da toma destes medicamentos. Para além da dispensa de medicamentos prescritos, foram muitas as situações onde o utente se dirigia à farmácia à procura do aconselhamento farmacêutico. Nestes casos, primeiramente recolhia todas as informações necessárias para um aconselhamento mais dirigido e sensato, como a idade da pessoa, os medicamentos que toma e patologias que já possuía. Posteriormente, focava-me nos sinais e sintomas que apresentava e descrevia, e a gravidade e duração dos mesmos. Tendo em conta todos os dados recolhidos, prestava então o meu aconselhamento que poderia passar por 3 situações diferentes: um aconselhamento com medidas não-farmacológicas, a introdução de um MNSRM apresentando as várias opções de tratamento e explicando as várias posologias, e por fim, caso se tratasse de uma situação mais complicada e para que a mesma fosse acompanhada de forma mais pormenorizada, dirigia o utente ao médico. Caso cedesse o MNSRM, procurei sempre explicar corretamente a posologia de modo a haver adesão à terapêutica, sendo que por vezes, no final de cada atendimento, pedia ao utente para que voltasse à farmácia para nos dar o feedback da resposta ao tratamento. Desta forma, o atendimento ao público revelou ser um desafio diário que procurei sempre melhorar, tentando assimilar o que me era ensinado de novo, aplicar os meus conhecimentos previamente adquiridos na faculdade e prestar um atendimento de qualidade, demonstrando empatia e interesse para com o utente que tinha à minha frente, adaptando-me a cada caso.

- Preparação de Medicamentos Manipulados: A FIF possui o serviço de formulação de medicamentos manipulados. Desta forma, nestes momentos, pude pôr em prática os meus conhecimentos de Farmácia Galénica e de Tecnologia Farmacêutica, uma vez que desenvolvia diversos medicamentos no laboratório presente na farmácia, assim como tinha de calcular o preço de cada medicamento manipulado (Anexo 2 e 3). Esta foi mais uma das atividades enriquecedoras que desempenhei, apesar da sua frequência ser baixa, uma vez que o número de opções terapêuticas é cada vez maior, e conseqüentemente o número de prescrições e pessoas que se deslocam à farmácia e precisam de um medicamento manipulado é cada vez mais reduzida.
- Dinamização do Espaço e Participação nas Formações: Os profissionais da FIF procuram organizar o espaço da farmácia de forma acolhedora, com boa visibilidade e sinalização dos vários produtos e marcas. A montra é reformulada regularmente, de forma a atualizar periodicamente a população acerca das promoções a decorrer e a enfatizar certas celebrações anuais como o Natal e a Páscoa, épocas festivas em que a FIF costuma

desenvolver atividades de solidariedade para ajudar locais em Coimbra com a contribuição de alimentos. Desta forma, pude frequentemente colaborar na elaboração das montras e dos lineares, e aplicar os meus conhecimentos de Marketing Farmacêutico, assim como de Organização e Gestão Farmacêutica, pelo que considero que esta atividade foi também um dos pontos fortes do meu estágio.

2.1.4. Autonomia e Responsabilidade

No decorrer do meu estágio, senti que todos os elementos da equipa da FIF me foram inculcando o sentido de autonomia e responsabilidade, para que de forma bastante rápida me sentisse confiante nas funções que desempenhava. Quer a autonomia como a responsabilidade foram bandeiras que procurei adquirir, uma vez que considero ambas as características fulcrais para qualquer função que irei desempenhar no futuro farmacêutico.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Descrédibilização Sentida por Parte dos Utentes

Ao longo dos tempos, a FIF tem recebido vários estagiários, pelo que a presença dos mesmos na farmácia é algo bastante comum para os utentes. Na maioria das vezes, os utentes demonstravam compreensão no atendimento, referindo o número da ficha para mais rapidamente consultar os seus dados ou até mesmo alertando-me para o facto de possuírem planos de complementaridade com o SNS.

No entanto, alguns utentes não se sentiam à vontade para ser atendidos por um estagiário, por sentirem que se trata de uma pessoa mais inexperiente. Assim, por vezes, alguns utentes solicitavam ser atendidos por um membro efetivo, ou até mesmo por um farmacêutico específico, negando o atendimento por parte de uma estagiária. Um dos exemplos mais notórios desta pouca confiança por parte do utente, era a dúvida que demonstravam acerca do preço do medicamento que iriam levar, quando o comparavam com o preço que referia no guia de tratamento.

Esta situação não foi muito recorrente, e por isso sinto que na maioria das vezes tive a oportunidade de dar a minha opinião e fazer o meu aconselhamento de forma autónoma, demonstrando ao utente confiança nos meus conhecimentos, e por sua vez sentir confiança por parte dos utentes em mim enquanto futura profissional de saúde.

2.2.2. Plano de Estudos do MICF

O plano curricular do MICF na FFUC prima pela diversidade de conteúdos lecionados, o que nos garante a aquisição de uma enorme diversidade de conhecimentos aplicáveis em várias áreas essenciais para a nossa carreira enquanto farmacêuticos. Contudo, com o decorrer do meu estágio verifiquei algumas lacunas no mesmo.

Enquanto estagiária, fui diariamente confrontada com inúmeras áreas sobre as quais me sentia bastante confiante em aconselhar, como Dermofarmácia e Cosmética, no entanto, em outras áreas do conhecimento sentia bastante dificuldade em aconselhar, devido à falta de conhecimentos que tinha sobre as mesmas. Destaco as áreas de produtos de dietética e suplementos alimentares e também a área de veterinária. Para além disso, senti um enorme desconhecimento ao nível de adesivos, material ortopédico, seringas e todos os outros produtos relacionados com esta área, que por sua vez são de extrema importância, uma vez que muitas pessoas recorrem à farmácia à procura dos mesmos e principalmente à procura de um aconselhamento acerca do tratamento de feridas, algo que não é lecionado ao longo do nosso plano de estudos.

Assim, destaco a necessidade de alargar e especificar o conhecimento nestas áreas, sendo interessante a resolução teórica e prática de casos clínicos que possam retratar a realidade do dia-a-dia nas farmácias comunitárias.

2.2.3. Determinação de Parâmetros Bioquímicos

Um dos pontos fracos que destaco no meu estágio foi a impossibilidade na determinação de parâmetros bioquímicos. Considero que a medição dos valores de glicémia e colesterol total são medições muito procuradas por muitos utentes, o que me ia permitir desenvolver tanto as minhas técnicas de medição como poder contribuir para a consciencialização da importância de manter um estilo de vida saudável, assim como ter hábitos alimentares equilibrados e praticar exercício físico. No período do meu estágio curricular, a FIF não tinha os equipamentos necessários para fazer estas medições, o que me impediu de desenvolver competências nesta área. Considero, então, que a impossibilidade de executar estas medições e interagir com os utentes nesta vertente, foi um ponto fraco no meu estágio.

2.2.4. Carreira Profissional

Por fim, o último ponto fraco que considero é a carreira profissional de um farmacêutico comunitário, uma vez que a profissão não tem uma evolução de carreira muito

apelativa. Desta forma, considero que não existe um futuro relativamente à carreira dos farmacêuticos, o que por consequência, resulta em trabalhadores desmotivados e insatisfeitos. Infelizmente, esta é a realidade do nosso país relativamente à FC, o que me entristece bastante, assim como o facto da profissão ser cada vez mais desvalorizada pela sociedade, algo lamentável visto que é uma profissão importantíssima para a saúde pública e de elevado contacto com a sociedade.

Este é um ponto bastante importante e que deveria ser tema de discussão em diversas palestras na Faculdade de Farmácia, de forma a incentivar os estudantes a seguir esta profissão e a entusiasamá-los relativamente ao seu futuro profissional.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Inovação Tecnológica dos Equipamentos e Serviços Prestados

A FIF possui dois sistemas de tecnologia que permitem rentabilizar o tempo de atendimento: o *Robot* e o *Cash Guard*.

O *robot* permite o armazenamento de um grande número de medicamentos, maioritariamente MSRM, e está ligado ao sistema SIFARMA[®], permitindo uma maior rentabilização do espaço da farmácia, assim como um maior controlo das validades, humidade, temperatura e luminosidade dos medicamentos, o que diminui a frequência de erros nos inúmeros atendimentos. Assim, considero-o uma oportunidade do meu estágio, pois permitiu-me ganhar tempo com o utente durante o atendimento, que de outra forma seria gasto a procurar o medicamento correto, e minimiza também o risco de ceder o medicamento errado.

Para além desta tecnologia, a FIF possui também o sistema de *cash guard* que armazena e regista todos os movimentos feitos por cada colaborador nos pagamentos em numerário. Assim, esta tecnologia facilitou bastante os pagamentos e devoluções durante o atendimento, diminuindo o tempo de espera por parte do utente e os erros que poderiam ocorrer no cálculo do troco.

2.3.2. Diversificação do Acompanhamento Farmacoterapêutico Prestado ao Utente

Ao longo dos 4 meses em que estagiei na FIF, senti que foi uma enorme oportunidade ser confrontada com situações clínicas muito diversificadas, uma vez que estando esta farmácia localizada no coração da cidade de Coimbra, é frequentada por muitas pessoas de classes etárias variadas. Desta forma, senti que perante estas situações, tive de realizar um

atendimento farmacoterapêutico adequado ao problema de saúde da pessoa que tinha à minha frente. Esta diversidade de atendimentos permitiu-me evoluir enquanto profissional de saúde e estar em constante aprendizagem, algo bastante desafiante e completo. Para enriquecer este tópico, apresento no Anexo I, 5 exemplos de casos práticos reais com os quais tive contacto durante o período de estágio, de forma a demonstrar a minha intervenção na diversidade de aconselhamentos que realizei.

Perante isto, concluo que o estágio foi uma enorme oportunidade para crescer a nível profissional e me preparar para o mundo do trabalho, visto que foram inúmeras as pessoas com quem contactei durante os 4 meses de estágio. Para além desta característica que desenvolvi, o estágio faz-nos crescer e evoluir também a nível pessoal, uma vez que nos tornamos mais sensíveis a certos problemas de saúde.

2.3.3. Dermocosmética e Suplementos Alimentares

O plano curricular do MICF é bastante extenso e completo, contudo, a farmácia comunitária acarreta um conjunto de áreas bastante amplo e sobre as quais durante a minha formação teórica foi impossível de aprofundar alguns conceitos, principalmente a nível prático.

Uma das oportunidades que mais senti foi, sem dúvida, a facto de poder adquirir novos conhecimentos práticos em Dermocosmética e Suplementos Alimentares, uma vez que a FIF possuía grandes lineares destas duas áreas, com uma variedade grande de produtos e marcas. Este tipo de produtos foi diariamente solicitado durante os atendimentos que realizei, pelo que inicialmente senti uma grande dificuldade em reconhecê-los e a fazer um atendimento de qualidade e completo. Com todo o apoio que senti por parte da equipa técnica, e algum estudo e esforço para reter o máximo de informação possível, comecei a conseguir aconselhar várias marcas e produtos com confiança e destreza. Desta forma, pude desenvolver melhor os conhecimentos que tinha nestas duas áreas, pondo em prática o que me ensinaram ao longo do plano de estudos do MICF.

2.3.4. Formação Contínua

A FIF prima pela sua atualização, aquisição de novos produtos e realização de formações individuais e em grupo para que o farmacêutico possa relembrar conhecimentos e estar a par das últimas novidades existentes no mercado.

Desta forma, a participação nas diversas formações externas e internas que a farmácia recebia foi, sem dúvida, uma enorme oportunidade, uma vez que eram os momentos onde adquiria um maior conhecimento dos produtos que a farmácia adquire, assim como recordava

determinados conhecimentos científicos aprendidos na faculdade. Para além disso, contribuíram para o aprimoramento das minhas técnicas de aconselhamento. Destaco, assim, diversas formações de indústrias e/ou gamas de produtos como: *Fluimucil*[®], *Voltaren*[®], *Dextazin*[®], *Lafemidia*[®], Skinceuticals, Vichy, Corega, BioActivo, entre outras.

2.4. Ameaças

2.4.1. Sazonalidade do Período de Estágio

O meu estágio curricular teve a duração de 4 meses, tendo início dia 9 de janeiro e término dia 21 de abril. Desta forma, passou-se essencialmente no período de inverno, apanhando apenas 1 mês da primavera. As estações do ano influenciam bastante a procura e a compra de certos medicamentos e produtos disponíveis para venda na farmácia. Desta forma, considero que a sazonalidade do período de estágio teve bastante impacto na minha experiência relativamente a certos medicamentos e produtos, sendo que considero esta uma ameaça para a realização do meu estágio.

Um exemplo desta categoria de medicamentos, são os descongestionantes nasais e as pastilhas para a garganta seca, irritada ou até inflamada. Esta categoria de produtos vende-se essencialmente no Inverno, uma vez que é neste período que aumenta o número de pessoas constipadas e com gripe. Por outro lado, os protetores solares é outra categoria bastante preponderante na FC que se vende mais ao longo do Verão, logo não tive oportunidade de contactar tanto com esta categoria de produtos.

Desta forma, concluo que o período sazonal quando realizei o meu estágio curricular de FC influenciou a minha experiência no atendimento e aconselhamento de certas categorias que se encontram à venda em FC.

2.4.2. Medicamentos Esgotados e Aparecimento de Novas Indicações Terapêuticas

No decorrer do meu estágio curricular, foram vários os medicamentos que se encontravam esgotados, o que acabou por se tornar uma ameaça ao meu estágio. Dentro dos inúmeros medicamentos que se encontravam esgotados durante o meu estágio, os exemplos mais marcantes são o *Ovestin*[®] e o *Ozempic*[®]. No primeiro caso, o princípio ativo que compõe este medicamento é o estriol, uma hormona importante para o tratamento da atrofia do trato genito-urinário inferior relacionada com deficiência estrogénica, nomeadamente secura vaginal. Este foi um caso bastante alarmante, uma vez que existe um elevado número de mulheres que utilizam esta opção terapêutica⁵. O outro exemplo é o *Ozempic*[®], um

medicamento composto pelo princípio ativo Semaglutido. Este medicamento é utilizado no tratamento de adultos com Diabetes Mellitus tipo 2 insuficientemente controlada, adjuvante à dieta e ao exercício⁶. Muitos médicos, utilizam este medicamento em *off-label* no controle da obesidade. Esta nova indicação terapêutica foi uma das causas que provocou a falta deste medicamento na FC, o que originou uma enorme falha terapêutica para os diabéticos e os obrigou a utilizarem outro antidiabético, apesar de na maioria dos casos o controle da doença não se verificar de forma tão notória. Para além destas duas situações, o alarido era tanto entre utentes, farmácias comunitárias e *social media*, que muitos utentes confundiam estes dois medicamentos, apesar de terem indicações completamente diferentes.

Estas situações acabam por causar um enorme descontentamento no utente e prejudicaram o meu atendimento, criando assim uma desvalorização no meu papel enquanto estagiária e até do próprio medicamento por parte do utente.

2.4.3. Locais de Venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM)

Segundo o Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de agosto, é permitida a venda de MNSRM em locais de venda fiscalizada (à semelhança das farmácias) pela agência reguladora do medicamento nacional, o INFARMED, I.P., uma vez que o Governo reconheceu que estes locais proporcionaram um maior acesso aos medicamentos⁷. Desta forma e tendo em conta que estes locais encontram-se atualmente espalhados por inúmeras superfícies comerciais e supermercados, está a aumentar o número de clientes e fidelizações destes espaços, constituindo assim uma forte ameaça nas vendas da FC e conseqüentemente do meu estágio enquanto farmacêutica comunitária. Para além da ameaça económica, o aconselhamento farmacêutico é algo muito procurado pela sociedade, e ao contrário do que acontece na maioria destes estabelecimentos, este aconselhamento é muito completo na FC. Desta forma, e tendo em conta a falta deste aconselhamento, muitas pessoas deslocam-se à farmácia para receber todo o apoio prestado pelo farmacêutico, sendo que muitos a seguir deslocam-se a um destes locais para comprar o produto, desrespeitando o trabalho do farmacêutico. Para além desta consequência, estes locais promovem a automedicação sem qualquer aconselhamento, o que poderá originar algumas situações de risco na saúde dos utentes.

Concluo que a existência e propaganda dos locais de venda de MNSRM constituem uma enorme concorrência para a FC e poderão promover atitudes desrespeitosas e de risco para os utentes.

2.4.4. Impossibilidade na Dispensa de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) para Situações *Minor*

Por fim, a última ameaça que considero aquando da realização do meu estágio curricular, é a impossibilidade da dispensa de MSRM para situações *minor*, situações onde o farmacêutico poderia intervir sem a necessidade do utente se deslocar ao hospital, diminuindo desta forma o trabalho do SNS. Existem inúmeras situações *minor* na FC, sendo que as infeções urinárias são um exemplo destas. A maioria destas infeções trata-se com um antibiótico de ação local. Muitas pessoas chegam à farmácia e queixam-se de uma pressão enorme na zona da bexiga e possível comichão na zona genital. Estas situações poderiam ser facilmente resolvidas pelo farmacêutico, onde o utente realizava um teste de urina na farmácia para confirmar que estava colonizado com alguma bactéria que estaria a provocar a infeção urinária, e de seguida, seria prescrito e cedido o medicamento pelo farmacêutico, diminuindo a carga dos hospitais e do SNS.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao concluir o meu estágio curricular na FIF, destaco a importância do farmacêutico na prestação de serviços de saúde de qualidade à população. De facto, o farmacêutico comunitário representa uma enorme importância para a sociedade, uma vez que são muitas as pessoas que recorrem ao farmacêutico em 1ª linha em situações de urgência, para esclarecer dúvidas e em busca de respostas acerca da sua medicação, ou simplesmente à procura de uma palavra amiga. Desta forma, revela-se de extrema importância o farmacêutico manter o seu espírito crítico ativo, estando aberto a novas aprendizagens, assim como investir diariamente na sua formação. Assim, o farmacêutico representa a ponte entre a vertente científica e a comunidade.

Reconheço que o estágio em FC se afirmou como uma das vertentes mais enriquecedoras do meu percurso académico, uma vez que proporcionou a aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo de 5 anos de muitas aprendizagens, assim como permitiu transpô-los para o contexto de trabalho de um farmacêutico no mundo real. Durante 4 meses, vivenciei e experienciei a realidade farmacêutica na sua plenitude: desde a desvalorização do farmacêutico e banalização do medicamento até à gratidão nos pequenos gestos, da complexidade de trabalhar em equipa até à capacidade de me moldar perante uma diversidade enorme de utentes. Todas as competências que desenvolvi e adquiri a nível pessoal e profissional vão, sem dúvida alguma, contribuir para um futuro mais promissor no mundo farmacêutico.

Aproveito para deixar uma palavra de agradecimento a todos os colaboradores da FIF que de seguida irei nomear: à Dra. Isabel, ao Dr. António, à Dra. Susana, à Dra. Nélia, ao Dr. Hugo, à Dra. Zaida, à Dra. Carolina, ao Joaquim e ao António – Um muito obrigada por todos os ensinamentos, todas as aprendizagens, toda a paciência e por todos os bons momentos que fizeram este estágio ser ainda mais enriquecedor. Sou hoje uma pessoa melhor, mas espero poder ser um dia tão especial como vocês.

Em suma, e olhando para todo o percurso que percorri durante estes 4 meses, posso concluir que foi um estágio muito completo e desafiante, e que me tornou uma pessoa melhor tanto a nível profissional como a nível pessoal, algo que posso dizer com toda a certeza que só no estágio de farmácia comunitária se aprende e, principalmente, se sente. Espero ansiosamente pela próxima etapa, com toda a certeza que todos estes ensinamentos irão acompanhar para sempre a minha carreira profissional.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **The legal and regulatory framework for community pharmacies in the WHO European Region.** [Consult. 9 jun. 2023]. Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326394>
2. SEARA.COM - **A Farmácia Comunitária** [Consult. 11 mai. 2023]. Disponível em <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
3. APEF – **Associação Portuguesa de Estudantes de Farmácia** - APEF, 16 dez. 2021. [Consult. 12 mai. 2023]. Disponível em <https://apef.pt/>
4. Ordem dos Farmacêuticos - **Regulamento nº 1015/2021** - [Consult. 10 jun. 2023]. Disponível em https://ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/0014300159_469595878620679aa0a805.pdf
5. Ovestin - [Consult. 9 jun. 2023]. Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
6. Ozempic - [Consult. 9 jun. 2023]. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ozempic-epar-product-information_pt.pdf
7. Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto - 23 mai. 2023. [Consult. 9 jun. 2023]. Disponível em https://www.infarmed.pt/documents/15786/1068384/035-B_DL_134_2005_3Alt.pdf
8. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Sibilla 2 mg + 0,03 mg, Comprimidos Revestidos por Película. - [Consult. 8 jun. 2023].
9. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Ben-u-ron 500 mg, Comprimidos. - [Consult. 7 jun. 2023].
10. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Brufen 400 mg, Comprimidos Revestidos por Película. - [Consult. 10 jun. 2023].
11. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Fluimucil 600 mg, Comprimidos Efervescentes. - [Consult. 8 jun. 2023].
12. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Strepsils Mentol e Eucalipto 1,2 mg + 0,6 mg. Pastilhas. - [Consult. 8 jun. 2023].
13. MENDES, Ana Paula - Tratar eficazmente e controlar a transmissão. 15 de junho).
14. **Tantum Verde Elixir 0.15%** - [Consult. 17 jun. 2023]. Disponível em

<https://www.tantum.pt/area-de-saude/saude-oral/tantum-verde-elixir-0-15/>

15. PRINT, Piere Fabre Digital Finger - **ELGYDIUM Clinic Cicalium – spray para aftas e lesões orais | Oral Care** [Consult. 17 jun. 2023]. Disponível em <https://www.pierrefabre-oralcare.com/pt-pt/p/elgydium-clinic-cicalium-spray-para-aftas-e-lesoes-orais-3577056017889-2a18b894>

16. Win-fit Multi – Win-fit Multi - [Consult. 18 jun. 2023]. Disponível em <https://winfitmulti.pt/>

17. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Imodium Rapid 2 mg. Comprimido Orodispersível. - [Consult. 9 jun. 2023]. Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

18. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento UL-250, 250 mg. Cápsulas. - [Consult. 9 jun. 2023]. Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

19. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Dioralyte. Pó para Solução Oral. - [Consult. 9 jun. 2023]. Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

20. INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento Telfast 120, 120 mg. Comprimido Revestido por Película. - [Consult. 9 jun. 2023]. Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

21. **Previpiq® Tropics - Repelentes - Produtos | Grupo Medifar** - [Consult. 18 jun. 2023]. Disponível em <https://www.medifar.pt/pt/produtos/repelentes/previpiq-tropics>

22. **Neovadiol - Rosto | Vichy** - [Consult. 18 jun. 2023]. Disponível em <https://www.vichy.pt/neovadiol/gama/r982.aspx>

5. Anexos

5.1. Anexo I - Casos Práticos

Nos presentes anexos, serão descritos alguns casos reais de aconselhamento farmacêutico nos quais tive de aplicar os meus conhecimentos teóricos à realidade durante um atendimento, aconselhando MNSRM, outros produtos de saúde e medidas não farmacológicas.

5.1.1 Caso Prático I: Dor de Garganta e Tosse com Expetoração

A utente A, do sexo feminino e com 34 anos, dirige-se à farmácia com queixas de dor de garganta e tosse, queixando-se também da garganta irritada. Comecei por questionar a utente se já tinha tomado algum medicamento para a dor de garganta, à qual me respondeu negativamente. De seguida, questionei se a tosse tinha expetoração, ao que me respondeu que sentia algo que “vinha do peito”, concluindo assim que era tosse com expetoração. Por fim, e relativamente à garganta irritada, percebi que esta estava relacionada com os dois sintomas anteriores. Depois de perceber melhor os sintomas que estava a sentir, questionei a utente se tomava alguma medicação crónica, à qual me respondeu que apenas tomava a pílula *Sibilla*⁸. A utente não se queixava de dores no corpo, febre ou outro sintoma respiratório.

Desta forma, e para aliviar os sintomas que apresentava, aconselhei a toma de Paracetamol 500mg para aliviar as dores de garganta que referia, aconselhando também que caso esta situação de dor evolui-se para febre deveria intercalar com Ibuprofeno 400mg. O Paracetamol é um analgésico de excelência, muito utilizado para o alívio de dores⁹, enquanto o Ibuprofeno é um anti-inflamatório muito indicado em situações de inflamação¹⁰. Para a tosse com expetoração aconselhei a toma de *Fluimucil*[®], um expetorante mucolítico e antioxidante composto por N-acetilcisteína¹¹. Por fim, complementei estes dois medicamentos com o aconselhamento da toma de umas pastilhas, as *Strepsils*[®] por exemplo, para aliviar a irritação na garganta que sentia¹².

À medida que fui apresentando os medicamentos que deveria tomar, fui aconselhando a forma correta como deveria tomar cada medicamento. O Paracetamol deveria tomar de 8 em 8 horas⁹, assim como o Ibuprofeno, intercalando estes dois medicamentos¹⁰. O *Fluimucil*[®] deveria tomar 1 comprimido por dia, de preferência depois de almoço para reduzir o desconforto no estômago causado pelo comprimido efervescente¹¹. Por fim, aconselhei a toma das pastilhas, que deveriam ser tomadas em cada 2 ou 3 horas, conforme o necessário

¹².

Por fim, aconselhei a utente a beber bastante água no período em que está a tomar o *Fluimucil*[®], uma vez que ajuda na libertação do muco ¹¹.

5.1.2. Caso Prático 2: Sarna

A utente B, do sexo feminino e com 30 anos, liga para a farmácia a questionar se na FIF fazíamos medicamentos manipulados, uma vez que tinha uma receita com um medicamento manipulado para o seu filho que se encontrava com sarna. Depois de pedir todas as informações necessárias para a preparação de um medicamento manipulado, procurei nos registos da farmácia o protocolo de como deveria preparar este medicamento. Tendo em conta que ainda não tínhamos preparado nenhuma vez este medicamento, recorri à Cimpi para me informar de como seria o protocolo para a preparação deste medicamento (Anexo 2).

O medicamento manipulado em questão era uma pomada de enxofre. Esta pomada é essencialmente composta por vaselina e enxofre, sendo ainda muito prescrita pelos médicos para o alívio dos sintomas provocados pela sarna, nomeadamente o prurido muito intenso. A sarna é mais comum no Inverno, provavelmente devido a uma maior aglomeração e contacto entre as pessoas, bem como à maior sobrevivência dos ácaros no tempo mais frio. Atualmente ainda existem muitos médicos a prescrever este medicamento, uma vez que as opções terapêuticas existentes na farmácia não são muitas e as existentes não têm resultados tão benéficos ¹³.

Preparei o medicamento manipulado, segundo o protocolo anexado e de seguida calculei o preço deste mesmo medicamento, tendo em conta os vários fatores necessários, como a forma farmacêutica do medicamento manipulado (Anexo 3).

Quando a utente se deslocou até à farmácia para vir buscar o medicamento, referi a forma como deveria aplicar o creme, sendo que o mesmo deve ser aplicado e mantido durante 24 horas, lavado e reaplicado durante 3 dias consecutivos. Para além destes avisos, informei também a mãe de algumas medidas não farmacológicas como a toma de banho pouco frequente e com água morna, a utilização de roupa de algodão de forma a diminuir o prurido e a utilização individual de toalhas e objetos pessoais de forma a diminuir a transmissão ¹³.

5.1.3. Caso Prático 3: Higiene Oral

O utente C, do sexo feminino e com 22 anos, dirige-se à farmácia com múltiplas aftas na boca, queixando-se que tem sentido um constante desconforto nos últimos dias, sem sentir

melhoras aparentes. Para além deste sintoma, refere também que se tem sentido bastante cansada nos últimos dias, devido à época de exames que enfrenta nesse mesmo momento.

Primeiramente e depois de perceber que a utente ainda não tinha recorrido a nenhuma medida farmacológica, aconselhei dois produtos para que melhorasse rapidamente: *Tantum*[®] Verde, um colutório para fazer a desinfeção da boca 2 a 3 vezes por dia ¹⁴, e *Cicalium*[®], um *spray* da Elgydium indicado para aftas que deve ser colocado 3 a 4 vezes por dia ¹⁵. O colutório mais aconselhado nesta situação é o *Tantum*[®] Verde, uma vez que um dos seus componentes é a benzocaína, um componente com ação anestésica que irá aliviar a sensação de incómodo que o utente se queixa ¹⁴. Relativamente ao *Cicalium*[®], optei pelo *spray* em vez do gel, a forma farmacêutica mais comum para esta situação, uma vez a aplicação do *spray* abrange uma área maior da boca, sendo desta forma mais fácil de aplicar e mais eficaz para utentes que têm inúmeras aftas no mesmo momento ¹⁵.

Por último, aconselhei a toma de um multivitamínico, como por exemplo o *Win Fit*[®], para repor as vitaminas e minerais que o utente possa precisar, e que de certa forma justificam o cansaço que se queixou no início do atendimento ¹⁶.

5.1.4. Caso Prático 4: Kit de viagem

O utente D, do sexo masculino e com cerca de 40 anos, chega à farmácia bastante apressado, pedindo-me inúmeros medicamentos para diversas situações que aparentemente não se interligavam. Com o decorrer do atendimento, rapidamente percebi que o utente iria fazer uma viagem à Índia no dia seguinte, precisando de levar consigo vários medicamentos de forma preventiva.

Desta forma e para levar consigo um *Kit de Viagem* completo, comecei por referir a necessidade de levar consigo Paracetamol e Ibuprofeno, ambos para uma possível dor de cabeça ou de barriga, febre ou outra situação possível de causar inflamação¹⁰.

De seguida, e tendo em conta os alimentos típicos deste país, aconselhei levar *Imodium Rapid*[®], *UL-250*[®] e *Dioralyte*[®]. Todos estes medicamentos são necessários em caso de uma gastroenterite. O *Imodium Rapid*[®] 2mg comprimido orodispersível, cujo princípio ativo é a Loperamida, está indicado para casos de diarreia aguda e crónica, atuando na redução do peristaltismo propulsivo. Este composto aumenta o tónus do esfíncter anal, reduzindo a incontinência e a sensação de urgência. Tendo em conta o seu mecanismo de ação, alertei o utente que deveria tomar 2 comprimidos em situações de urgência e 1 comprimido após uma dejeção diarreica, devendo evitar ao máximo o seu uso excessivo, uma vez que irá ser prejudicial nas gastroenterites, visto que o agente patogénico irá permanecer no organismo.

Avisei ainda para o facto de se tratar de um comprimido orodispersível e que por isso deve ser dissolvido na boca através da saliva ¹⁷. Para repor a flora intestinal, e depois deste possível episódio irá ficar alterada, aconselhei a toma do *UL-250*[®]. Este medicamento é formulado na forma de cápsulas e deve ser tomado 3 vezes por dia ¹⁸. Para evitar situações de desidratação, aconselhei o utente a manter uma boa ingestão de líquidos para hidratar e repor eletrólitos, para auxiliar, aconselhei a toma de *Dioralyte*[®], um medicamento composto por glicose, cloreto de sódio, cloreto de potássio e citrato dissódico. Estes compostos estimulam a absorção de água e eletrólitos e previnem a desidratação que a diarreia poderá provocar. Deve ser ingerida 1 saqueta após cada dejeção, dissolvendo a mesma em água, para evitar situações mais graves de desidratação e fraqueza. Caso os sintomas não passassem dentro de 2/3 dias ou houvesse febre, deveria consultar um médico urgentemente ¹⁹.

Por fim e tendo em conta que a Índia é um país com bastantes mosquitos, aconselhei o utente a levar um anti-histamínico oral, o *Telfast*[®] 120mg (composto por fexofenadina) para aliviar o prurido intenso que poderá sentir com as picadas destes insetos. Deverá ser tomado 1 vez por dia e de preferência ao deitar, uma vez que poderia causar sonolência ²⁰. Sugeri ainda levar um repelente de insetos de aplicação tópica, que se encontram comercializados na forma de *sprays*, *roll-on* e pulseiras. Estes repelentes têm na sua composição componentes de origem natural, como a citronela, ou de origem sintética, como o DEET (N, N -dietil-m-toluamida), composto presente no *Previpiq*[®]. Optei por escolher o *Previpiq*[®] com 50% de DEET, uma vez que o mais aconselhado para a utilização em países tropicais e expliquei que o repelente deveria ser aplicado nas zonas expostas e/ou roupa e que a aplicação deveria ser renovada de acordo com as informações disponibilizadas na embalagem para esse efeito. Como medidas não farmacológicas, deveria evitar coçar a zona da picada e, no caso de aparecerem bolhas, não as deveria rebentar ²¹.

Por fim e tendo em conta que se dirigiu à farmácia por pedido da sua esposa, pedi-me para avaliar se estava a comprar todos os medicamentos necessários para as situações mais recorrentes que podem acontecer neste país, ao qual respondi afirmativamente alertando também para algumas medidas não farmacológicas, como não beber água ser estar engarrafada e evitar comer alimentos frescos sem estarem cozinhados, uma vez que a Índia é um país onde não existe um controlo restrito na qualidade da água e deste tipo de alimentos, estando estes muitas vezes contaminados com parasitas, podendo provocar inúmeras infeções.

5.1.5. Caso Prático 5: Dermocosmética

A utente E, do sexo feminino e com 65 anos, dirige-se à farmácia à procura de uma nova linha de cosméticos para implementar na sua *skin care*. Desta forma, e tendo em conta a que o fator sensorial é bastante importante nestes produtos, pedi para se dirigir à zona da farmácia onde se localiza a cosmética, onde dei continuidade ao meu atendimento.

Primeiramente analisei a pele da senhora para aconselhar uma linha de cosmética mais adequada. Esta utente apresentava uma pele mais madura e seca, com alguns sinais de envelhecimento, como rugas e algumas manchas. Após esta primeira análise e tendo em conta que existem inúmeras linhas de cosméticos na FIF, questionei a senhora se tinha preferência acerca da marca, à qual me respondeu negativamente. Tendo em conta esta resposta, optei por escolher a linha de menopausa da Vichy, denominada por Neovadiol. Esta linha é composta por um creme de dia e um creme de noite, para pessoas em fase pré-menopausa e pós-menopausa. Inclui também um sérum e um creme para contorno de olhos. Desta forma, aconselhei estes 4 produtos à utente e expliquei que deveria aplicá-los pela seguinte ordem: sérum, creme de dia, creme para contorno de olhos e à noite, depois de fazer a limpeza da sua pele, deveria aplicar o creme de noite. Reiterei ainda a importância de colocar protetor solar, uma vez que este projete a nossa pele de um dos seus maiores agressores, o sol, e referi que deveria aplicá-lo após a aplicação do creme diário²².

5.2. Anexo 2 - Ficha de Preparação do Medicamento Manipulado

Receita Médica Nº




 * 2 0 1 1 0 0 0 6 4 0 3 8 6 7 4 8 0 2 *

MM

Utente: SAAC SALVADOR MENSA FERREIRA Entidade Responsável: SNS Nº. de Beneficiário:	 RC: * 2 6 8 4 1 1 5 2 0 *	
 * M 4 1 2 7 7 *	NURIA MADUREIRA PEDIATRA	CHUC CHC HP CEXT  * U 0 6 7 0 8 0 *
R DCI / nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia		
1 pomada de enxofre (precipitado ou sublimado), 6%, 300 g. Manipulado de enxofre a 6%, 18 g e vaselina qb para 300 g. FSA Posologia: Duração prolongada.	N.º Extenso 1 Uma	Identificação Ótica  * 7 9 8 8 1 2 1 *
2 3 4	Validade: 30 dias Data: 2023-01-16	
 (Assinatura do Médico Prescritor)		

Preparado por: [redacted] - Prescrição Médica nº 440 - 2023-01-16

Caro Dr. Pedro

Na sequência da sua questão, descreve-se abaixo uma formulação, com preparação manual ou em homogeneizador mecânico, sendo que para esta última poderá excluir a vaselina líquida. O enxofre é habitualmente utilizado de 5% a 10% no tratamento da escabiose, sendo a dosagem mais habitual a de 6%.

Pomada de Enxofre a 6% (m/m)

NOTA: Recomenda-se a preparação de cerca de 50 g por pessoa e por aplicação, dependendo da sua superfície corporal.

Fórmula galénica:

Constituintes	Quantidade
Enxofre sublimado ou precipitado *	6 g
Vaselina líquida (preparação manual)	q.b. (4 a 6 g)
Vaselina branca ou filante	Qbp 100 g

* Enxofre sublimado (enxofre sublimado depurado, flor de enxofre) é equivalente ao enxofre precipitado tanto a nível das suas características físico-químicas (nomeadamente, de solubilidade) como no seu uso e concentrações terapêuticas. No entanto, o enxofre sublimado é menos tóxico do que o enxofre precipitado, já que apresenta um grau de divisão menor, pelo que preferencialmente, o composto de enxofre a utilizar deve ser o enxofre sublimado.

Cuidados de manipulação:

Manipular o enxofre ao abrigo da luz (enxofre é fotossensível) e da humidade (enxofre é higroscópico).

Técnica de preparação (manual):

1. Em recipiente previamente tarado, pulverizar o enxofre e adicionar a quantidade mínima necessária de vaselina líquida, de modo a obter uma dispersão homogênea;
2. Pesár a mistura anterior de modo a determinar a quantidade necessária de vaselina filante, de modo a completar a massa de 100 g;
3. Pesár a vaselina filante;
4. Espátular a dispersão anterior numa porção de volume equivalente de vaselina filante;
5. Adicionar porções homogêneas da restante quantidade de vaselina, sob espátulação;

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=6a7126de5f&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1660866422266096703&siml=msg-f%3A16608664...> 1/7

- rotular até obtenção de pomada de coloração amarela homogénea;
7. Proceder ao controlo de qualidade (ver Formulário Galénico Português, Cap. 3.1. Ponto 7 ou consultar abaixo "Outros esclarecimentos");
8. Embalar e rotular.

Técnica de preparação (mecânica):

1. Previamente, registar os seguintes pesos (taras a utilizar durante a preparação e no controlo de qualidade):
 - a) Recipiente de homogeneizador mecânico, com tampa;
 - b) Recipiente de homogeneizador mecânico, sem tampa;
 - c) Recipiente de homogeneizador mecânico, sem tampa e com hélice;
2. Pesar 10 g de vaselina branca, para o recipiente de homogeneizador mecânico;
3. Pesar o enxofre directamente para o mesmo recipiente;
4. Adicionar à mistura contida no homogeneizador mecânico mais 10 g de vaselina branca, de modo a cobrir o enxofre (perfazendo cerca de 20% da vaselina);
5. Fechar o frasco e misturar a velocidade elevada (ex.: 1500 rpm durante 1');
6. Abrir o frasco e verificar se a mistura obtida apresenta uma coloração amarela homogénea:
 - o Se necessário misturar a velocidade elevada (ex.: 1500 rpm durante 1');
7. Directamente para o recipiente de homogeneizador mecânico, pesar a restante quantidade de vaselina branca (de modo a completar a massa de 100 g);
8. Fechar o frasco e misturar a velocidade elevada (ex.: 1500 rpm durante 3');
9. Deixar repousar cerca de 30" (de modo a evitar sobreaquecimento da mistura);
10. Misturar a velocidade elevada (ex.: 1500 rpm durante 3');
11. Deixar repousar cerca de 30" (de modo a evitar sobreaquecimento da mistura);
12. Misturar a velocidade elevada (ex.: 1500 rpm durante 3');
13. Abrir o frasco e verificar se a mistura obtida apresenta uma coloração amarela homogénea:
 - o Se necessário misturar a velocidade elevada (ex.: 1500 rpm durante 3');
14. Proceder ao controlo de qualidade (ver Formulário Galénico Português, Cap. 3.1. Ponto 7 ou consultar abaixo "Outros esclarecimentos");
15. Embalar e rotular.

Acondicionamento:

Embalagem estanque e opaca, ao abrigo da luz e em local fresco e seco.

Prazo de utilização:

Não se encontram descritos estudos de estabilidade para este manipulado. Assim, podemos atribuir, de acordo com as normas gerais de atribuição de prazos de utilização aos medicamentos manipulados da Farmacopeia Americana (descritas na USP 42), um prazo de utilização de 90 dias.

Aplicação Terapêutica:

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=6a7f26de5f&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A16608664222660967038&siml=msg-f%3A16608664...> 2/7

tem aplicação tópica na dermatite e como parasiticida no tratamento da sarna, pitiríase e tricoftíase. É usado em concentrações de 5 % em eczemas crónicos, secos e escamosos, 5-10% em tratamento de acne, escabiose, pitiríase, seborreia e dermatofitoses e de 10 a 20% em hiperqueratose, ictiose e psoríase muito escamosa.

Poderá também ser utilizado isoladamente ou em associação com resorcina, ácido salicílico e outros produtos com acção sinérgica, ou com protectores e adstringentes como o óxido de zinco e calamina.

Cuidados na aplicação:

Evitar o contacto com os olhos, boca e mucosas

Não usar em crianças com menos de 2 anos, excepto se houver prescrição médica e justificação clínica.

Específicos do Tratamento para a Escabiose

❖ Instruções correctas e pormenorizadas ao doente:

- Sem necessidade de banho quente prévio, deve aplicar-se uma fina camada em toda a superfície corporal, desde o pescoço até aos pés, incluindo as palmas e plantas, com especial atenção aos espaços interdigitais, punhos, unhas das mãos e pés (cortar as unhas previamente e aplicar nas unhas e debaixo das unhas), cotovelos, axilas, mamas, glúteos, zona periumbilical e genital (não aplicar nas mucosas- ex.: mucosa genital e anal).
- Em bebés e crianças de menor idade (até aos 2 a 5 anos, idade varia conforme os autores), em idosos e em doentes imunodeprimidos deve incluir -se o couro cabeludo, face, pescoço e orelhas. Evitar o contacto com os olhos.
- A pomada de enxofre é aplicada durante 3 noites consecutivas, retirando-se o medicamento pela manhã (8h a 12h depois) com banho.
- Se o doente aplica a pomada nele próprio não deve lavar as mãos depois da aplicação (nem durante pelo menos 8h, se lavar reaplicar a pomada), se for aplicado por outro este deve usar luvas descartáveis. Não levar as mãos à boca (usar protecção), dada a toxicidade deste fármaco. Tomar banho apenas no dia seguinte (8h a 12h depois da aplicação).
- Deve ser efectuado o tratamento tópico simultâneo de todos os contactantes corporais e do agregado familiar, mesmo que não revelem prurido ou erupção cutânea
- Geralmente é repetido o tratamento após 1 semana (variável entre diferentes autores).
- Na escabiose norueguesa, deve ainda considerar que as crostas que caem da pele dos doentes, permitem que os ácaros presentes nestas crostas sobrevivam durante dias no ambiente, pelo que as mesmas devem ser adequadamente eliminadas do meio ambiente (tapetes e mobiliário aspirado e o saco do aspirador deverá ser eliminado imediatamente, fechado num saco hermético).

❖ Cuidados Não Farmacológicos

- Lavar a roupa usada antes do tratamento (roupa do corpo, da cama, adereços de vestuário, etc.) no ciclo quente a 60° e secar a roupa a quente durante 20 minutos ou passar muito bem (insistir nas dobras) a roupa a ferro quente.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=6a7f28de5f&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1660866422266096703&simpl=msg-f%3A16608664...> 3/7

do modo, seguindo o disposto no n.7. da Parte II do Anexo à Portaria nº 594/2004, a Farmácia deve efectuar o mínimo os seguintes ensaios de verificação ao produto semi-acabado, imediatamente antes do seu acondicionamento e rotulagem:

- Avaliação das características organolépticas (ex.: aspecto, cor, odor e sabor (se aplicável), etc.);
- Avaliação da conformidade do produto semi-acabado com a definição em Farmacopeia Portuguesa 9, para a forma farmacêutica preparada;
- Verificação da massa ou volume final da preparação multidose, cujo valor deve corresponder à quantidade ou ao volume prescrito, admitindo-se um desvio que não ultrapasse nem por excesso, nem por defeito 5% da quantidade ou volume prescrito e rotulado, ou seja, $\pm 5\%$ face ao prescrito/ rotulado.

Sempre que necessário, são ainda efectuados os seguintes ensaios não destrutivos:

Forma Farmacêutica	Ensaio
Formas farmacêuticas sólidas	Uniformidade de massa (quando aplicável *)
Formas farmacêuticas semi-sólidas, multidose	pH (quando aplicável **)
Soluções não estéreis	Transparência/ Partículas em suspensão (quando aplicável ***) pH (quando aplicável **)
Suspensões não estéreis	pH (quando aplicável **)

* Aplicável a formas farmacêuticas sólidas, em dose unitária.

** Quando o valor de pH é especificado como ensaio a realizar:

- na monografia da fórmula oficial, inscrita no Formulário Galénico Português (compêndio aceite pelo INFARMED);
- ou na monografia genérica de forma farmacêutica, inscrita na Farmacopeia Portuguesa 9;
- ou sempre que as indicações compendiais descrevem o valor de pH como um factor crítico para a estabilidade da substância activa e/ou do medicamento manipulado.

*** Aplicável a soluções, cujos excipientes sejam, tal como a substância activa, solúveis no solvente.

Os resultados destes ensaios de verificação são registados pelo operador na respectiva ficha de preparação do medicamento manipulado. Estes ensaios de verificação são supervisionados pelo Farmacêutico (supervisor), que aprova ou rejeita o medicamento manipulado, conforme os resultados obtidos, registando na respectiva ficha de preparação a sua avaliação final, devidamente rubricada. A Direcção-Técnica da Farmácia deve executar ou supervisionar o controlo de qualidade ou, no mínimo, aprovar a ficha de preparação e a informação nesta redigida, libertando assim o lote de medicamento manipulado para dispensa ao utente. A aprovação pela Direcção-Técnica da Farmácia deverá ser adequadamente validada, com rubrica/ assinatura e data, pelo farmacêutico director-técnico.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=6a7126de5f&view=pt&search=all&permithd=thread-f%3A1660866422266096703&simpl=msg-f%3A16608664...> 5/7

A roupa que não pode ser lavada a quente deve ser mantida fechada em saco hermético durante 4 dias.

- Todos os cremes, desodorizantes e outros produtos que tenham contactado com a pele do indivíduo infectado, devem ser rejeitados.
- Destaca-se ainda a seguinte informação:

6. Infection Control Precautions

If scabies is suspected in a hospitalised patient, please contact the Infection Control Team for advice.

When caring for people with both typical and crusted scabies in healthcare facilities disposable gloves should be worn during contact and for 24 hours following treatment. Individuals should be isolated until after the first application of treatment.

If crusted scabies is suspected, disposable gloves and gowns (with long sleeves) should be worn. Individuals with crusted scabies should be isolated until after the completion of the full course of treatment.

The spread of classical scabies without direct person-to-person contact is rare. However, the recovery of live mites from chairs and couches in the homes of patients with scabies supports the use of environmental measures. All carpets and upholstered furniture should be vacuumed, and the vacuum bag immediately discarded. Ideally, clothes, bed linen and towels should be machine washed at 60°C and machine dried the day after the first treatment. The mites die quickly at temperatures >55°C. Items that cannot be laundered may be kept in a sealed plastic bag for at least 48 to 72 hours or in a freezer at -20°C for 72 hours.

Reacções Adversas:

A aplicação prolongada pode originar secura cutânea, irritação da pele e dermatite.

Cuidados na aplicação:

O enxofre pode manchar a roupa e possui um odor característico desagradável.

Esta formulação não foi testada laboratorialmente no LEF

Outros esclarecimentos

Controlo de Qualidade

A Farmácia deve proceder a todas as verificações necessárias para garantir a adequada qualidade final do medicamento manipulado. Estas verificações são efectuadas segundo a legislação aplicável e cumprindo ainda as especificações inscritas na monografia do Formulário Galénico Português (compêndio aceite pelo Infarmed) sempre que são preparadas fórmulas oficiais, bem como as especificações das monografias genéricas de formas farmacêuticas, inscritas na Farmacopeia Portuguesa 9.

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=6a7f26de5f&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1660866422266096703&siml=msg-f%3A16608664> 4/7

5.3. Anexo 3 – Cálculo do Preço do Medicamento Manipulado

FARMÁCIA ISABEL FOLHAS		FICHA DE PREPARAÇÃO					
Cálculo do preço de venda							
Matérias-primas:							
Matérias-primas	Embalagem existente em armazém		Preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/ IVA)		Quantidade a usar	Factor multiplicativo	Preço da matéria-prima utilizada na preparação
	Quantidade adquirida	Preço de aquisição (s/ IVA)	Quantidade unitária	Preço			
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
Subtotal A							€
HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:							
	Forma Farmacêutica	Quantidade	F (€)	Factor Multiplicativo	Valor		
Valor referente à quantidade base				X	=		
Valor adicional			X	X	=		
Subtotal B							€
MATERIAL DE EMBALAGEM:							
Materiais de embalagem		Preço de aquisição (S/ IVA)	Quantidade	Factor Multiplicativo	Valor		
FRASCO CONTA-GOTAS				X 1.2	=		
				X 1.2	=		
				X 1.2	=		
Subtotal C							
PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO:				(A + B + C) x 1.3			
				IVA			
				D			
OUTROS CUSTOS INCORPORADOS:							
Rótulo (s)	Preço de Aquisição (C/ IVA)		Quantidade	Valor	Subtotais		
Dispositivos Auxiliares							
Subtotal E							
PREÇO FINAL D + E							
Operador:				Supervisor:			
				Rubrica da DT:			
							Data: / /

PARTE II

Relatório de Estágio de Indústria Farmacêutica

Abbvie

Estágio Orientado pelo Dr. Rui Rodrigues

LISTA DE ABREVIATURAS

BCL-2 - B-Cell Lymphoma 2

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

INFARMED - Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, I.P

LLC - Leucemia Linfocítica Crónica

LMA - Leucemia Mieloide Aguda

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

NHLs - Linfomas Non-Hodgkin

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*

I. INTRODUÇÃO

Desde o início do meu percurso académico na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), compreendi que o papel do farmacêutico não passa apenas pela farmácia comunitária. Desta forma, desde cedo percebi que gostaria de envergar por outras áreas do medicamento e compreender melhor o ciclo do medicamento. Ao longo dos meus 5 anos de curso desenvolvi inúmeras competências em diversas áreas do medicamento, no entanto a Tecnologia Farmacêutica e o *Marketing* Farmacêutico suscitaram em mim bastante interesse e curiosidade. Desta forma, percebi que o meu futuro no mundo farmacêutico teria de passar por estas áreas de conhecimento. O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) prepara-nos para a integração no mercado de trabalho nas variadas saídas profissionais, através da aquisição de uma grande diversidade de conhecimentos e a consciencialização das várias áreas farmacêuticas, desde a farmácia comunitária, farmácia hospitalar, indústria farmacêutica, análises clínicas e investigação científica.

O MICF da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é organizado em 5 anos, sendo que a última etapa do plano de estudos consiste na realização de um estágio curricular em Farmácia Comunitária e noutra área do medicamento. Esta dualidade de estágios destaca a FFUC a nível nacional pelo facto do seu plano de estágios ser mais abrangente e completo. De acordo com os meus interesses e competências, optei por realizar o meu segundo estágio na Indústria Farmacêutica. Deste modo, propus-me a realizar um estágio curricular na *AbbVie*, no departamento de Oncologia.

A possibilidade de estagiar na *AbbVie* foi sem dúvida alguma uma oportunidade única, abrindo-me inúmeras portas para o meu futuro profissional, assim como me permitiu conhecer um pouco do que é o mundo da Indústria Farmacêutica.

O presente relatório pretende retratar o Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica experienciado privilegiadamente por mim, o qual teve início a 2 de maio de 2023 e posterior conclusão a 28 de julho de 2023, na *AbbVie*, sob atenta orientação do Dr. Rui Rodrigues.

2. ABBVIE

A *AbbVie* é uma empresa Biofarmacêutica com foco no desenvolvimento de novos medicamentos com vista a proporcionar um impacto notável na qualidade de vida do doente, o centro de toda a investigação desta empresa. Da mesma forma, melhorar o acesso aos medicamentos comercializados pela *AbbVie*, tal como inovar para dar resposta aos maiores e mais difíceis desafios científicos e médicos, mostram-se ser também os principais objetivos desta farmacêutica¹.

Embora a *AbbVie* tenha sido lançada recentemente, apresenta uma história de crescimento bastante duradoura com origem numa empresa farmacêutica, a *Abbott*, fundada em 1888. Em janeiro de 2013, a *AbbVie* foi fundada como uma empresa Biofarmacêutica independente da *Abbott*, com a qual continua a partilhar uma história em comum e fortes perspetivas para o futuro. A partir desta separação, verificou-se uma evolução notável com a aprovação do primeiro medicamento criado pela *AbbVie*, o *Humira*[®], direcionado para o tratamento da Hepatite C, disponibilizado em Portugal em 2014 e participado em 2018². Em 2019, foram disponibilizadas três novas terapêuticas que abrangem as seguintes patologias: Psoríase, Doença de Parkinson e Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). No ano seguinte, além da disponibilização da terapêutica para a Artrite Reumatoide, ocorreu a aquisição da *Allergan*, o que permitiu englobar uma enorme variedade de novas áreas terapêuticas, assim como o extenso portfólio desta empresa.

Desta forma, as áreas de foco terapêutico desenvolvidas nesta Biofarmacêutica são a Oncologia, Imunologia, Virologia, Neurociências e Oftalmologia, assim como Medicina Estética devido à aquisição da *Allergan*. Devido à intervenção predominante nestas áreas terapêuticas, a *AbbVie* garante o tratamento de mais de 60 condições terapêuticas, o acesso dos doentes aos seus produtos em mais de 175 países, o que permite que mais de 62 milhões de doentes possam ser tratados todos os anos com os diferentes medicamentos desenvolvidos¹.

3. ONCOLOGIA NA ABBVIE – UMA ÁREA DE ENORME POTENCIAL E ASCENSÃO FUTURA

Na *AbbVie* Portugal, a área da Oncologia foca-se essencialmente na área de Hematologia, abrangendo essencialmente três situações clínicas: Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Linfomas Non-Hodgkin (NHLs). Tem como centro um medicamento comum, o *Venclyxto*[®], o qual tem como princípio ativo o Venetoclax e como mecanismo de ação, o bloqueio da proteína BCL-2, essencial para as células sobreviverem e expressa em abundância nas células cancerígenas, contribuindo desta forma para a destruição das mesmas e para o controlo da doença³. Em breve será aprovado o *Tepkinly*[®], o qual tem como princípio ativo o Epcoritamab, um anticorpo biespecífico com afinidade dupla para o recetor CD3 das células T citotóxicas e para o recetor CD20 das células tumorais, contribuindo desta forma para a sinalização e destruição das células tumorais.

O meu estágio curricular foi realizado no Departamento de Oncologia, na área de *Marketing*, estando também em permanente contacto com a área de *Medical Affairs, Regulatory* e *Market Access*. A equipa de Oncologia é constituída por uma equipa de doze pessoas: Inês

Camacho, Rui Rodrigues, Pedro Mendonça, Joana Ferreira, Diogo Baía, Cláudia Patrocínio, Francisco Fernandes, Raquel Vilas, Cláudia Pinto, Ana Brás, Pedro Branco e António Rodrigues. Ao longo do meu estágio, tive oportunidade de desempenhar essencialmente funções na área de *Marketing*, sendo que tive também a oportunidade de contactar com o trabalho dos Delegados de Informação Médica. Desta forma, o meu estágio foi bastante completo e enriquecedor, sendo que a possibilidade de contactar com esta área terapêutica – a Oncologia – e a sua realidade médica foi, sem dúvida, uma enorme oportunidade para o início da minha carreira profissional como farmacêutica.

4. ANÁLISE SWOT

No presente relatório, irei realizar uma reflexão crítica sobre o meu estágio curricular na AbbVie, expondo os conhecimentos que adquiri, as atividades que realizei e as observações que considero pertinentes. Tal como preconizado nas “Normas Orientadoras de Estágio do MICEF”, irei realizar uma análise *SWOT*, acrónimo das palavras *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*. Estes quatro parâmetros têm como objetivo ajudar-me a fazer uma avaliação pessoal dos fatores internos e externos que caracterizaram e influenciaram o meu estágio como estagiária. Desta forma, esta análise irá contemplar pontos fortes e pontos fracos (fatores internos) desta fase da minha formação, assim como irá destacar os pontos que considero oportunidades e ameaças (fatores externos) que abrangem a Indústria Farmacêutica e que se relaciona, diretamente, com o meu estágio.

4.1. Pontos Fortes

4.1.1 Equipa Multidisciplinar – Integração, Acompanhamento e Formação Contínua

Um dos pontos fortes que destaco no meu estágio de Indústria Farmacêutica, é, sem dúvida, a equipa multidisciplinar, uma vez que a mesma se mostrou totalmente disponível e prestável, desde o primeiro dia do meu estágio.

A equipa de Oncologia é composta por doze pessoas, sendo que cada um dos elementos da equipa colaborou sempre no meu processo de aprendizagem, ajudando-me a aplicar os conhecimentos adquiridos durante os 5 anos de formação teórica e a superar todas as dificuldades sentidas diariamente. A equipa tem uma organização de excelência, estando cada elemento encarregue de inúmeras tarefas bem distintas, mas que culminam na maximização das potencialidades de cada um, de forma a atingir-se uma maior rentabilidade.

Desde o primeiro dia em que fui acompanhada pela Dra. Ana Trovão e pelo Dr. Pedro Mendonça e da primeira reunião realizada com o Dr. Rui Rodrigues, percebi que esta tinha

sido a oportunidade de uma vida. A amabilidade, a dedicação sentida por todos e a boa disposição fazem parte de todos os elementos integrantes da *AbbVie*, e especialmente da equipa de oncologia, sendo características bastante vivenciadas por todos.

Resta-me agradecer a toda a equipa por desde o primeiro dia me sentir parte integrante da mesma, por ter sido tão bem orientada e acompanhada por todos e por me fazerem sentir mais confiante, autónoma e responsável em todas as funções desempenhadas. Tanto a nível profissional como a nível pessoal, concluo este estágio mais enriquecida e esclarecida acerca do meu futuro.

4.1.2. Planeamento do Estágio

Considero que o planeamento do meu estágio curricular foi bastante importante para desde o início me sentir integrada e orientada relativamente às minhas funções. Sendo a primeira estagiária no departamento de Oncologia, foi feito um plano com inúmeras tarefas para cumprir nos três meses de estágio, podendo passar por diversas áreas nomeadamente o *Marketing, Medical Affairs, Regulatory, Digital* e até *Market Access*. Sendo a *AbbVie* uma indústria multinacional de grande prestígio e de enorme qualidade, para além desta formação, foi-me também disponibilizada formação sobre as várias áreas terapêuticas desenvolvidas na *AbbVie*. Desta forma, tive várias *Inductions* e cursos online que se revelaram ser bastante importantes na minha integração na empresa e no seu portfólio. Para além destas formações, participei também em vários projetos nomeadamente no “Vídeo do Doente de LMA” e “Nutrição do Doente de LMA” para a *AbbVie Care*, no lançamento de *Venclyxto*[®] para doentes com LMA, e no *Approved Email* e *Mass Email* do *Tepkinly*[®].

4.1.3. Inductions

Como forma de integrar os novos membros na equipa da *AbbVie* assim como ficar a conhecer as várias áreas terapêuticas e os diversos departamentos, nas primeiras semanas de estágio tive várias *Inductions*, reuniões demonstrativas por parte de todos os departamentos da empresa com o objetivo de dar a conhecer as diferentes áreas terapêuticas, as principais atividades de cada departamento, bem como os respetivos membros. Desta forma, tive a oportunidade de conhecer um pouco dos diversos departamentos, nomeadamente o departamento de Farmacovigilância, Assuntos Regulamentares, *Medical Affairs*, Ensaio Clínicos, entre outros. Considero que as *Inductions* foram um dos pontos fortes do meu estágio, uma vez que cheguei ao final destas semanas com uma noção geral de todas as funções

desempenhadas dentro da empresa e das possíveis áreas que poderia escolher no meu futuro profissional, assim como me senti mais integrada com todos os colaboradores.

4.1.4. Diversidade das Funções Desempenhadas

Outro ponto forte que destaco no meu estágio é, sem dúvida, a diversidade de tarefas que pude desempenhar. O início do meu estágio passou por muito estudo e aprendizagem, uma vez que tive de ficar a par de todos os projetos desenvolvidos e em desenvolvimento na Oncologia, desde a fisiopatologia das doenças abordadas anteriormente, os ensaios clínicos realizados, às guidelines utilizadas pelos médicos, entre outros documentos de elevada importância. No final de Maio comecei a realizar a tradução de um documento denominado por “Nutrição do Doente de LMA”, o qual irá fazer parte integrante do programa *AbbVie Care* disponibilizado pela empresa para todos os doentes que utilizam *Venclyxto*[®]. De seguida, executei a tradução de um vídeo que retrata o testemunho de um doente com LMA, o qual também irá fazer parte do programa *AbbVie Care*. Ambas os projetos são relativos à LMA e mais direcionados pela Dra. Joana Ferreira, *Brand Manager* de LMA.

Em Junho, dei início o outro projeto: o *Approved Email* e o *Mass Email* do *Tepkinly*[®], documento que irá ser lançado aquando do lançamento deste medicamento. Neste projeto pude perceber melhor o trabalho da equipa de *Marketing* desempenhava, e pude contactar com outras áreas: Digital, Regulamentar e Médica. Ainda no mês de Junho, tive a oportunidade de fazer parte da organização do lançamento do *Venclyxto*[®] para doentes com LMA, evento este que deveria ser seguido da comparticipação deste medicamento pelo INFARMED, I.P., no entanto e por vários motivos burocráticos, a comparticipação do mesmo encontra-se atrasada.

No mês de Julho, tive a oportunidade de passar dois dias com os Delegados de Informação Médica da equipa do *Venclyxto*[®] para LLC. Foram dias muito enriquecedores, onde pude perceber com os meus próprios olhos outra saída profissional que poderei seguir no futuro.

Ao longo dos meses, tive também a oportunidade de contactar com vários médicos, uma vez que todas as semanas são realizadas consultorias, com o objetivo de perceber as opções terapêuticas que existem nos vários hospitais do país, assim como as opções preferidas de cada médico e os seus pontos de vista.

4.1.5. Autonomia e Responsabilidade

Por fim, no decorrer do meu estágio, senti que todos os elementos da equipa de oncologia me foram inculcando o sentido de autonomia e responsabilidade, para que de forma bastante rápida me sentisse confiante nas funções que desempenhava. Desta forma, senti que todas as tarefas que desempenhei eram de grande responsabilidade, sendo que sempre me senti auxiliada e supervisionada pela equipa, o que sempre me motivou e me tornou mais confiante nas diversas tarefas. Quer a autonomia como a responsabilidade foram qualidades que procurei adquirir, uma vez que considero ambas as características fulcrais para qualquer função que irei desempenhar no futuro farmacêutico. É um grande privilégio ter desempenhado funções de tanta responsabilidade, e ter sentido que toda a equipa confiava em mim para desempenhar todas estas funções.

4.2. Pontos Fracos

4.2.1. Conhecimento das Várias Áreas do Medicamento e Possíveis Carreiras

Considero que deveria ser dado um acompanhamento mais próximo aos alunos, assim como deveria ser dado o conhecimento das várias áreas profissionais, nomeadamente pelos vários professores que lecionam as diversas cadeiras ao longo dos cinco anos. Tendo em conta o nosso desconhecimento sobre as carreiras profissionais, seria bastante interessante incluir um pouco deste ponto em cada cadeira, para que de certa forma, o aluno se sentisse mais acompanhado no final do curso e para conseguir escolher o estágio curricular em função do mesmo. Poderiam ser também organizadas mais atividades, onde iriam ser desenvolvidos estes temas e poderiam ser convidadas pessoas relevantes das diversas áreas que pudessem contar a sua história perto dos alunos do MICF.

4.2.2. Plano de Estudos do MICF

O plano curricular do MICF na FFUC prima pela diversidade de conteúdos lecionados, o que nos garante a aquisição de uma enorme diversidade de conhecimentos aplicáveis em várias áreas essenciais para a nossa carreira enquanto farmacêuticos. Contudo, com o decorrer do meu estágio verifiquei algumas lacunas no mesmo.

Enquanto estagiária, fui diariamente confrontada com inúmeras áreas sobre as quais me sentia bastante confiante, nomeadamente Assuntos Regulamentares e Farmácia Hospitalar, no entanto, em outras áreas do conhecimento senti algumas dificuldades, devido à falta de conhecimentos que tinha sobre as mesmas. Destaco a área de *Marketing* Farmacêutico, uma vez que esta cadeira é focada em determinadas áreas, nomeadamente em *Market Access*,

deixando algumas áreas em falta que serão bastantes importantes na carreira profissional. Para além disso, senti um enorme desconhecimento ao nível da área financeira, uma área fulcral em qualquer área terapêutica e que todos os profissionais farmacêuticos deveriam ter mais noções para desempenhar melhor os seus cargos.

Assim, destaco a necessidade de especificar o conhecimento nestas áreas, sendo interessante o desenvolvimento das mesmas com determinadas atividades mais práticas e no terreno.

4.3. Oportunidades

4.3.1. Importância da Realização do Estágio na Indústria Farmacêutica

No decorrer do meu percurso académico e pelo mundo farmacêutico ser uma realidade próxima de mim a nível familiar, sempre tive um *mindset* que o MICF me iria abrir inúmeras oportunidade no meu futuro profissional. Apesar de ainda existir o estigma de que a maioria dos farmacêuticos são farmacêuticos comunitários, esta não é uma realidade do mundo de hoje, sendo que o MICF deverá acompanhar sempre a realidade do mundo de trabalho.

Sem desvalorizar a profissão do farmacêutico comunitário, a oportunidade de realização do estágio de indústria farmacêutica é sem dúvida alguma uma enorme mais-valia para o nosso currículo, assim como para a nossa experiência profissional. Desta forma, considero que esta é uma enorme oportunidade dada aos alunos da FFUC, sendo que deverão envergar desde cedo neste mundo e começar a definir desde logo o percurso que irão querer traçar no mundo farmacêutico.

4.3.2. Oncologia - Uma Área Crescente e Repleta de Oportunidades

Com quase 10 milhões de mortes por ano, o cancro continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo. Encontrar meios eficazes para combater o cancro tem sido um dos principais objetivos dos investigadores, apresentando constantemente enormes desafios, não só na investigação e na descoberta de novas moléculas e terapêuticas, como também no acesso destas terapêuticas aos doentes⁴. Desta forma, a oncologia é uma área terapêutica que, infelizmente, está cada vez mais presente na vida de muitas pessoas em todo o mundo, sendo uma área onde existe ainda um longo caminho científico por fazer, com inúmeras e grandes oportunidades.

Considerando-me uma pessoa curiosa que procura constantemente por novos desafios, esta é uma área que me desperta bastante interesse e que suscita em mim muita

curiosidade. Para além do mais, é uma área em constante evolução e numa fase crescente, sendo por isso uma área que me irá permitir crescer a nível profissional.

4.3.3. Medicamento Venclxyto®

O Venclxyto® é um inibidor da BCL-2, proteína necessária para as células sobreviverem, principalmente as células cancerígenas, uma vez que esta proteína é mais expressa nestas células. Este medicamento irá bloquear esta proteína, induzindo a apoptose da célula. Está aprovado para LLC e LMA, sendo que nesta última indicação ainda não tem participação aprovada.

Ao longo do meu estágio, tive oportunidade de desempenhar funções na equipa de Oncologia que dirige estas duas indicações, sendo que surgiram diversas oportunidades para crescer e aprender em ambas, principalmente em LMA, uma vez que esta indicação terapêutica ainda tem muitos desafios e oportunidades pela frente. Por outro lado, e tendo em conta que este é um medicamento relativamente recente, ainda há um percurso enorme a percorrer, tanto na disponibilização do medicamento a nível hospitalar como a nível de participação.

4.3.4. Um dia como Delegado de Informação Médica

A equipa de oncologia é composta pela *Brand Team* e pela *In Field Team*, nomeadamente por quatro delegados de informação médica, que desempenham visitas aos hematologistas dos vários centros hospitalares do país. Considero que a oportunidade de passar um dia com dois dos quatro delegados da equipa *In Field* foi uma grande oportunidade, uma vez para além de poder conhecer outra realidade profissional, permitiu-me conhecer novos médicos e as suas perspetivas relativamente à Oncologia, ao nosso medicamento, assim como aos tratamentos atuais. Foi um grande privilégio acompanhar os delegados nestes dias de trabalho, assim como contactar diretamente com outra realidade profissional.

4.4. Ameaças

4.4.1. Duração do Período de Estágio

Considero que uma das ameaças do meu estágio, é a duração do mesmo, uma vez que três meses de estágio é um período muito curto para adquirir todos os conhecimentos que poderia aprender no estágio de Indústria Farmacêutica.

Tendo em conta o período de três meses do estágio que realizei na *AbbVie*, sinto que estes três meses passaram bastante rápido. Tendo a consciência que esta foi uma oportunidade realmente única, considero que ainda assim este período deveria ser mais longo para os alunos

que pretendem seguir este percurso profissional. Como exemplo, sugeria um estágio de quatro meses, onde neste período o aluno poderia passar por pelo menos por duas áreas na Indústria Farmacêutica, para ter a oportunidade de conhecer as áreas em causa, assim iria permitir escolher a minha área predileta para um futuro profissional próximo de forma mais conscienciosa e segura.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao concluir o meu estágio curricular na *AbbVie*, destaco a versatilidade do farmacêutico por conseguir desempenhar uma enorme variedade de funções em variadas áreas do medicamento. Desta forma, é bastante notório que o farmacêutico desempenha diversas tarefas desde a produção até à venda e comercialização do medicamento. É de extrema importância os alunos ao longo do curso terem conhecimento desta versatilidade, assim como a faixa etária mais nova, para que, desde cedo, reconheçam a importância da profissão, assim como desenvolvam um interesse pela mesma. O farmacêutico, independentemente da área terapêutica aonde se insere, deve permanecer aberto a novas aprendizagens do conhecimento, assim como deve estar aberto a abraçar novas carreiras e oportunidades profissionais, principalmente na Indústria Farmacêutica, característica que a mesma considera ser bastante importante.

Reconheço que o estágio em Indústria revelou ser uma das vertentes mais enriquecedoras do meu percurso académico, uma vez que me permitiu conhecer um mundo enorme de oportunidades profissionais, assim como me realizou a nível profissional e pessoal, uma vez que percebi que poderei mudar e melhorar a vida dos doentes oncológicos no nosso país e pelo mundo fora, um dos maiores objetivos que tenho desde o início do meu percurso académico. Durante três meses, vivenciei e experienciei a realidade farmacêutica na sua plenitude: desde o trabalho de escritório aos dias de reuniões, à organização de diversos eventos e aos dias passados a ler e a estudar variados documentos.

Aproveito para deixar uma palavra de agradecimento a todos os colaboradores da *AbbVie* que de alguma forma contribuíram para a minha aprendizagem e bem-estar ao longo destes três meses. Foram várias as pessoas que marcaram o meu percurso de forma especial, por me inspirarem desde o primeiro dia com a sua carreira profissional, assim como pelas pessoas maravilhosas que revelaram ser em tantos momentos vivenciados. Um obrigada a toda a equipa que me proporcionou um estágio tão completo e enriquecedor, principalmente à Inês Camacho, ao Rui Rodrigues, ao Pedro Mendonça e à Joana Ferreira, uma vez que estiveram mais de perto ao longo dos três meses. Foram todos elementos essenciais e cada

um ensinou-se de forma diferente, mas bastante consistente, as várias formas para crescer enquanto profissional.

Em suma, e olhando para todo o percurso que percorri durante estes três meses, posso concluir que foi um estágio muito completo e desafiante, e que completou e superou todos os objetivos e expectativas que tinha desde o início do mesmo. Mesmo não contactando com o doente de forma direta, o farmacêutico tem a possibilidade de ajudar a tornar possível o desejo de inúmeras pessoas em todo o mundo: a cura contra o cancro. Um dia prometi que iria fazer alguma diferença nesta área, e apesar de muitas vezes ser uma área complexa, difícil e bastante amarga, é cada vez mais possível dar a tantas pessoas a oportunidade de passarem mais um Natal com a família, de verem o casamento da filha ou o nascimento do neto. Um dia tiraram-me tudo isso e nesse mesmo dia, prometi a mim mesma que iria fazer algo para mudar este fim amargo. Terminei este estágio com a consciência que poderei intervir nesta área terapêutica e mudar o destino de tantas famílias no meu futuro profissional, sendo certo os inúmeros passos que esta área terapêutica pode dar num futuro próximo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AbbVie | Investigação e Desenvolvimento Farmacêutico - [Consult. 1 set. 2023]. Disponível em <https://www.abbvie.pt/>
2. Humira - Medicamentos - A Nossa Ciência | AbbVie - [Consult. 7 set. 2023]. Disponível em <https://www.abbvie.pt/our-science/products/humira.html>
3. Venclyxto - [Consult. 7 set. 2023]. Disponível em <https://www.abbvie.pt/our-science/products/Venclyxto.html>
4. KRISTENSEN, L. S. *et al.* - Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field. **Oncogene**. ISSN 1476-5594. 37:5 (2018) 555–565. doi: 10.1038/onc.2017.361.

PARTE III

MONOGRAFIA

“As Novas Abordagens Terapêuticas de RNA:
Circular RNA, Self-amplifying RNA e Trans-amplifying RNA”

Monografia Orientada pelo Professor Dr. João Nuno Moreira

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR - Região 3' não traduzida

5'UTR - Região 5' não traduzida

ACUPA - Ácido S,S-2[3-[5-amino-1-carboxipentil]ureido]pentanodióico

anti-PD-1 - Anticorpo de morte programada - 1

APCs - Células apresentadoras de antígenos

BCG - Vacina Bacillus Calmette- Guérin

CD4 - Células T reguladoras

CD8 - Células T citotóxicas

CHC - Células do carcinoma hepatocelular

circRNA - *Circular RNA*

CiRNA - circRNA intrónico

COVID-19 - Doença Coronavírus - 19

CRC - Cancro colorretal

DLin-DMA - 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano

DLin-MC3-DMA - (6Z,9Z,28Z,31Z)-Heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimetilamino)butanoato

DOPE - 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

DOTAP - 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano

DOTMA - 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamônio-propano

DSPC - 1,2-diestearoil-snglicero-3-fosfocolina

dsRNAs - RNAs de fita dupla

EcircRNA - circRNA exónico

EliciRNA - circRNA exónico-intrónico

EPR - Efeito de permeabilidade e retenção

FDA - *Food and Drug Administration*

GC - Guanina citocina

GIONs - Nanopartículas de óxido de ouro-ferro

IRES - Local de entrada do ribossoma interno

LNPs - *Lipid nanoparticles*

m6A - N6-metiladenosina

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal

MIRES - Local de envolvimento do ribossoma induzido

miRNA - MicroRNA

NK - Células *Natural Killer*

ORF - Região de codificação

PAMPs - Padrões moleculares associados a agentes patogênicos conservados

PEG - Polietilenoglicol

PEI - Polietilenoimina

PLA - Ácido poli-l-láctico

PLGA - Poli (dl-láctido-co-glicólido)

Pré-mRNA - Pré-RNA mensageiro

PRRs - Recetores de reconhecimento de padrões

PVA - Álcool polivinílico

RES - Sistema reticuloendotelial

RPDR - RNA polimerase dependente de RNA

RT-qPCR - PCR quantitativa de transcriptase reversa

saRNA - *Self-amplifying RNA*

SARS-CoV-2 - Síndrome Respiratório Severo e Agudo Coronavírus 2

siRNA - RNA de interferência

SNPs - *Solid nanoparticles*

STING - Estimulador dos genes de interferão

taRNA - *Trans-amplifying RNA*

TR - *Transreplicon*

tricRNA - circRNA intrónico de tRNA

tRNA intrónico - RNA de transferência intrónico

RESUMO

As vacinas de mRNA contra o SARS-CoV-2 suscitaram muita curiosidade e interesse na plataforma do mRNA. Devido às suas limitações de produção e armazenamento, assim como à eficácia limitada que apresenta, a plataforma do RNA tem sido continuamente investigada, surgindo novas tecnologias nomeadamente o *Self-amplifying RNA (saRNA)*, o *Trans-amplifying RNA (taRNA)* e por fim o *Circular RNA (circRNA)*, uma plataforma descoberta há muitos anos, mas que só nos dias de hoje suscitou curiosidade por parte dos investigadores. Estudos demonstram que a entrega destas plataformas de RNA poderá ocorrer sem a utilização de nanotransportadores, no entanto, são necessárias doses mais elevadas, sendo a eficácia de entrega mais baixa. Desta forma, a utilização da nanotecnologia veio trazer uma melhoria na entrega destas tecnologias às células-alvo, uma vez que o RNA está protegido das nucleases e poderá ser direcionado para atingir determinado alvo. Nanopartículas de origem polimérica, nanopartículas de origem lipídica e nanopartículas inorgânicas são alguns dos nanotransportadores utilizados para encapsular estas classes de RNAs. Estudos estão a ser constantemente elaborados para investigar a eficácia destas classes em doenças oncológicas, sendo que muitos investigadores acreditam no seu potencial para melhorar a vida e a saúde dos doentes oncológicos.

PALAVRAS-CHAVE

Cancro, *Circular RNA*, mRNA, Nanotecnologia, Nanotransportadores, *Self-amplifying RNA*, *Trans-amplifying RNA*.

ABSTRACT

mRNA vaccines against SARS-CoV-2 have raised a lot of interest in the mRNA platform. Due to its production and storage limitations, as well as its limited efficacy, the RNA platform has been continuously investigated, with new technologies emerging, namely *Self-amplifying RNA (saRNA)*, *Trans-amplifying RNA (taRNA)*, and finally o *Circular RNA (circRNA)*, a platform discovered many years ago, but which has only aroused curiosity among researchers nowadays. Studies have shown that these RNA platforms can be delivered without the use of nanocarriers, however, they require higher measurements and lower delivery efficiency. In this way, the use of nanotechnology has improved the delivery of these technologies to target cells, once the RNA is protected and can be directed to reach the specific target. Nanoparticles of polymeric origin, nanoparticles of lipidic origin and inorganic nanoparticles are some of the nanocarriers used to encapsulate these classes of RNAs. Studies are constantly being developed to investigate the efficacy of these classes in oncological diseases, and several researchers believe in their potential to improve the life and health of cancer patients.

KEYWORDS

Cancer, *Circular RNA*, mRNA, Nanocarriers, Nanotechnology, *Self-amplifying RNA*, *Trans-amplifying RNA*

I. INTRODUÇÃO

A biotecnologia, uma área em constante evolução, permite que novos avanços continuem a remodelar a nossa compreensão relativamente ao tratamento de doenças e intervenções terapêuticas. O desenvolvimento e o sucesso das vacinas constituídas com mRNA dirigidas ao SARS-CoV-2 despertaram um novo interesse na utilização de vacinas de RNA contra doenças infecciosas e doenças oncológicas, particularmente com a utilização de plataformas de vacinas constituídas com *Circular RNA* (circRNA), *Self-amplifying RNA* (saRNA) e *Trans-amplifying RNA* (taRNA)¹.

O cancro é uma doença muito complexa que se desenvolve por várias etapas incluindo a resistência à morte celular (apoptose), o crescimento celular descontrolado, as alterações na sinalização celular, a invasão celular, a metastização e a angiogénese. Geralmente começa por se formar um tumor localizado, sendo que este se pode espalhar e formar metástases em diversos locais do corpo. São vários os fatores que contribuem para o aparecimento do cancro nomeadamente a poluição, radiação, vida sedentária, dieta desequilibrada, hereditariedade, entre outros. Qualquer um destes fatores pode causar um dano nos genes do DNA, conhecidos como oncogenes, que poderão levar ao aparecimento do cancro, visto que estas alterações originam células imortais e com capacidade de se auto-replicarem a uma velocidade bastante elevada, podendo levar à morte do doente². O cancro é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, causando cerca de 9,6 milhões de mortes todos os anos. Tal acontece devido à falta de ferramentas de diagnóstico precisas para os estadios iniciais do cancro, assim como terapêuticas direcionadas e eficazes³. O diagnóstico precoce tem uma enorme importância para controlar o desenvolvimento da doença e a proliferação das células cancerígenas, podendo melhorar as taxas de sobrevivência dos doentes. Por outro lado, e depois de diagnosticado, são necessárias terapêuticas otimizadas com sistemas de administração direcionadas para atingir as células tumorais com maior precisão e, conseqüentemente, provocar menos efeitos secundários⁴.

A imunoterapia pode fornecer respostas anticancerígenas poderosas e duradouras em doentes com tumores avançados ou doentes com metástases resistentes à terapia convencional. As terapêuticas com RNA visam aumentar a capacidade do sistema imunitário em reconhecer estas células, interferindo nos principais mecanismos reguladores imunológicos⁵.

No entanto, a instabilidade das várias classes de RNA, assim como a presença de várias barreiras fisiológicas que inibem a entrega e a transfecção do RNA, são os fatores que dificultam a aplicação do mesmo na terapia contra o cancro⁶. Desta forma, a imunoterapia

juntamente com a nanotecnologia poderá ser uma ajuda para compreender melhor certos mecanismos que limitam o tratamento imunológico do cancro, assim como ultrapassar os diversos desafios que impedem que estas terapêuticas sejam um sucesso⁷. A entrega eficiente do RNA é crucial para o sucesso da sua tradução em aplicações terapêuticas, logo o desenvolvimento de várias plataformas baseadas em nanopartículas, como lipossomas, nanopartículas poliméricas e nanopartículas inorgânicas, oferece um futuro promissor na entrega das várias terapêuticas com RNA e nas suas aplicações contra o cancro⁸.

2. TERAPIAS COM RNA – O PANORAMA ATUAL

As terapêuticas e vacinas baseadas em mRNA estão a surgir como uma nova e importante classe de medicamentos, provocando uma grande revolução no tratamento de várias doenças, incluindo as doenças oncológicas. O conceito de fármacos constituídos com ácidos nucleicos foi demonstrado pela primeira vez por Wolff K, em 1990, onde num estudo de referência, uma injeção direta de mRNA transcrito *in vitro* ou de DNA plasmídico no músculo esquelético de ratinhos, deu origem a uma expressão eficaz da proteína codificada *in vivo*⁹. Posteriormente em 1996, foi realizado o primeiro estudo de uma vacina contra o cancro constituída com mRNA, onde foram testadas células dendríticas com RNA *in vitro*¹⁰, sendo que em 2001, surgiu o primeiro ensaio clínico com terapêuticas baseadas com mRNA⁹. Passadas quase 3 décadas, os avanços na ciência permitiram uma melhor compressão nos mecanismos de entrega do RNA, assim como as suas diferenças estruturais. Com as inúmeras descobertas feitas ao longos dos anos, o papel do RNA revelou-se cada vez mais crucial e promissor¹¹. As moléculas de RNA, incluindo mRNA, o microRNA (miRNA) e o RNA de interferência (siRNA), participam em vários processos celulares, desempenhando um papel fundamental na regulação da expressão genética e atuando como intermediários entre a informação genética codificada no DNA e a síntese de proteínas, sendo que cada tipo de RNA tem uma estrutura diferente, assim como um mecanismo de ação distinto¹².

Desta forma, e devido a estas diferenças estruturais, é notório que os vários tipos de RNA têm capacidade de atingir genes ou vias específicas, tendo por isso, a capacidade de conseguir atingir locais de ação mais inalcançáveis e uma enorme versatilidade na modulação da expressão génica, assim como constituem um caminho para a medicina personalizada e o seu potencial futuro¹³.

2.1. Características Estruturais e Mecanismo de Entrega do mRNA

As terapêuticas baseadas nos vários tipos de RNA oferecem várias vantagens em relação aos medicamentos tradicionais, onde na maioria das vezes são utilizadas moléculas sintéticas. Desta forma, as terapêuticas que utilizam RNA têm inúmeras diferenças que as distinguem das restantes, devido às características estruturais dos distintos tipos de RNA¹⁴.

O mRNA é a forma transcrita do DNA e transporta as instruções necessárias para a codificação da síntese de proteínas. Após transcrição, o mRNA é submetido a modificações pós-transcricionais, incluindo a poliadenilação e o *splicing*, etapas necessárias para garantir a sua estabilidade e funcionamento. O mRNA processado é posteriormente enviado do núcleo da célula para o seu citoplasma, onde irá ser modelo para a tradução de proteínas e irá originar a produção de antígenos específicos. Consequentemente, as células apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam os antígenos produzidos e associados ao tumor no Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I e de classe II, o que irá originar uma resposta imunitária, nomeadamente a ativação de células T citotóxicas e a produção de anticorpos específicos do tumor ou contra o agente infeccioso¹⁰. Desta forma, as vacinas de mRNA oferecem inúmeras vantagens, uma vez que têm a capacidade de induzir respostas imunitárias robustas e direcionadas, assim como garantir uma adaptabilidade para produzir uma grande variedade de antígenos, sem integrarem o genoma do hospedeiro¹⁰.

O mRNA consiste em cinco domínios funcionais fundamentais: a estrutura 5'-cap, a região 5' não traduzida (5'UTR), uma região de codificação (ORF), a região 3' não traduzida (3'UTR) e uma cauda poli(A) (Figura 1). Estes componentes afetam a estabilidade, a eficiência da tradução e as propriedades de imunogenicidade, sendo que todos poderão passar por processos de otimização⁹. As abordagens de *design* e otimização poderão ser na ORF, nomeadamente com a incorporação de nucleótidos quimicamente modificados e o enriquecimento da cadeia com sequências GC, sequências mais rápidas de traduzir. Para além destas alterações, podem ser feitas alterações nas regiões não codificadas¹⁵. Os elementos 5'UTR e 3'UTR adjacentes à sequência de codificação são consideradas zonas críticas no *design* ideal de uma vacina, pois têm um impacto significativo na estabilidade do mRNA. A otimização dos elementos 5'UTR com a utilização de 5'UTRs mais curtos é ideal para a tradução, uma vez que irá evitar a presença de codões iniciais neste local que interrompam a tradução e, consequentemente, evita a presença de estruturas secundárias altamente estáveis que afetam o recrutamento dos ribossomos e o reconhecimento de codões. Todas estas modificações aumentam a eficiência e o tempo de semivida do mRNA¹⁶. Para além destas, é evidente que a estrutura de 5' - cap é essencial para a síntese eficaz da proteína mRNA, uma vez que regula

o *splicing* do pré-mRNA assim como a exportação nuclear, atua como uma estrutura protetora que protege o RNA da clivagem das exonucleases e inicia a tradução do mRNA¹⁷. O último componente, a cauda poli(A), estabiliza o mRNA e promove a tradução de proteínas. O comprimento apropriado da cauda de poli(A) é crucial para a regulação da translação e estabilidade do mRNA retardando a degradação do RNA pelas RNA exonucleases, sendo diretamente proporcional à eficácia translacional¹⁸. Por fim, é crucial fazer uma otimização no formato de entrega do mRNA. Devido à estrutura carregada negativamente do RNA e ao seu tamanho molecular elevado, o mRNA é propenso à degradação por nucleases e pode não conseguir atravessar as membranas celulares¹⁹. Desta forma, são necessárias técnicas para se conseguir ultrapassar estes problemas, nomeadamente a utilização de veículos de entrega sintéticos, como lipossomas e nanopartículas lipídicas (LNPs), estruturas de tamanho nano projetadas para proteger o mRNA da degradação enzimática e permitir a sua entrega eficiente às células-alvo²⁰.

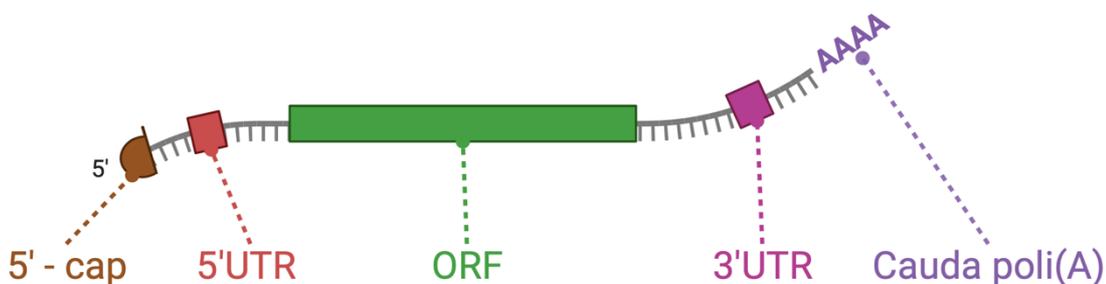


Figura 1 - Elementos estruturais essenciais do mRNA: região 5' - cap, região 5' não traduzida (5'UTR), região de codificação (ORF), região 3' não traduzida (3'UTR) e cauda poli(A). Adaptado de ²¹. A figura foi criada com o BioRender.com

2.2. O Tratamento de Doenças Oncológicas com a Utilização do mRNA

A utilização do mRNA em inúmeras áreas terapêuticas tem merecido uma especial atenção, uma vez que esta tem demonstrado ser uma via promissora no tratamento de inúmeras doenças imunológicas, nomeadamente no contexto das doenças infecciosas e no cancro²².

Nos últimos anos, a imunoterapia tem surgido como uma grande estratégia no tratamento do cancro, uma vez que é uma abordagem terapêutica que modela dinamicamente o sistema imunológico para reconhecer e destruir células cancerígenas. O desenvolvimento de vacinas contra o cancro é uma estratégia promissora de imunoterapia para induzir respostas imunológicas específicas e duradouras, uma vez que provocam respostas imunes celulares e humorais que suprimem o crescimento do tumor¹⁰.

Os antígenos tumorais podem ser classificados em (1) antígenos associados ao tumor, proteínas não mutadas que são superexpressas nas células cancerígenas, e (2) antígenos de diferenciação, produtos de genes silenciosos, (3) antígenos tumorais universais e (4) antígenos oncovirais. Estes tipo de antígenos pode ser expresso nas células normais, aumentando o risco de toxicidade autoimune induzida pela vacina. Para além deste tipo de antígenos, existem também os (5) antígenos específicos do tumor, que se apresentam especificamente nas células tumorais e geralmente não são exibidos pelas células normais. Podem ser neoantígenos, antígenos únicos e específicos do tumor, resultantes da instabilidade genética das células cancerígenas. Têm uma afinidade maior pelo MHC e imunogenicidade potente, provocando uma produção de células T específicas do tumor com toxicidade limitada “fora do alvo”. Desta forma, os neoantígenos tornaram-se o principal alvo de vacinas contra o cancro nos últimos anos²⁰.

Existem duas estratégias de vacinação contra o cancro: a estratégia preventiva ou profilática, e a estratégia terapêutica. A estratégia preventiva visa induzir memória imunológica administrando vacinas a indivíduos doentes para prevenir o aparecimento de vários tipos de cancro. Exemplos destes tipos de vacinas são a vacina contra o vírus da hepatite B e a vacina contra o papilomavírus humano. No entanto, nem todos os cancros podem ser evitados com este tipo de vacinas e nem todos são causados por um vírus. Neste momento, nenhuma vacina preventiva contra o cancro não viral foi aprovada para uso em humanos. A estratégia terapêutica pretende tratar a doença, impulsionando ou reativando o próprio sistema imunológico do doente. São exemplos deste tipo de vacinas, a vacina *Bacillus Calmette- Guérin* (BCG) contra o cancro da bexiga e uma vacina constituída com células dendríticas (Sipuleucel-T) contra o cancro da próstata resistente à castração. Existem inúmeras vacinas contra o cancro em desenvolvimento ou em fase de pesquisa pré-clínica ou clínica²⁰.

Nos últimos anos, estudos aprofundados de mecanismos imunológicos e o desenvolvimento de várias vacinas avançaram muito toda esta área de investigação²⁰. Um dos exemplos mais notórios na história da ciência foi o rápido desenvolvimento e sucesso das vacinas baseadas em mRNA contra o SARS-CoV-2 em resposta à pandemia da COVID-19, resultado de anos de pesquisa explorando vacinas de mRNA para o tratamento do cancro¹⁰. Estas vacinas são constituídas por mRNA modificado por nucleótidos que codificam várias glicoproteínas do SARS-CoV-2, tendo como objetivo a produção de antígenos contra este vírus, através da tradução deste mRNA em antígenos direcionados para combater este vírus, especificamente o antígeno S2-P. A entrega do mRNA através de LNPs e o facto do mRNA ser modificado por nucleótidos para evitar a ativação precoce de genes associados ao interferão, são características únicas que contribuem para a eficácia da vacina²³.

Para além das doenças infecciosas, existem inúmeros ensaios em desenvolvimento de vacinas de mRNA como uma terapêutica contra o cancro, sendo que o objetivo das mesmas é a estimulação do sistema imunitário para este reconhecer e atacar as células tumorais com precisão. Ao incorporar antigénios tumorais específicos do doente em sequências de mRNA, os investigadores pretendem ativar uma resposta imunológica robusta e adaptada ao perfil de cancro do doente. Desta forma e com o fim de tornar estas terapêuticas uma realidade no tratamento do cancro, estão em curso inúmeros ensaios pré-clínicos e clínicos para avaliar a eficácia e segurança destas vacinas de mRNA²⁴.

Num ensaio clínico de fase I, foram administradas vacinas de mRNA não formuladas por via intranodal em 13 doentes com melanoma em estadio III ou IV com doença estável, resposta parcial ou resposta completa anterior²⁴. Esta vacina direcionada a neoepítomos codificou uma mutação tumoral única e individualizada com dez neoepítomos selecionados para cada doente. Todos os doentes desenvolveram respostas imunitárias recrutando as células T contra numerosos neoepítomos codificados pela vacina, e respostas clínicas relacionadas à vacina foram observadas em dois (40%) dos cinco doentes com melanoma em estadio IV²⁵. Outro ensaio clínico de fase I recentemente concluído, foi desenvolvido com a participação de 20 doentes com melanoma (estádios IIc, III e IV), onde foi administrada por via intranodal uma vacina de mRNA não formulada. A vacina incluía mRNAs que codificam três moléculas ativadoras de células dendríticas e cinco antigénios associados a tumores²⁶. Um ensaio de fase I avaliou a segurança e eficácia de uma vacina de mRNA lipoplex (BNT111) que codifica quatro antigénios associados a tumores de melanoma em doentes com melanoma avançado expressando pelo menos um dos quatro antigénios. As respostas imunes contra um ou mais antigénios associados ao tumor foram detetadas em mais de 39 (75%) dos 50 doentes, e o BNT111 induziu respostas de células T reguladoras (CD4) e células T citotóxicas (CD8). Noutro ensaio clínico, 17 doentes receberam BNT111 juntamente com terapia anti-PD-1 padrão, seis (35%) desses doentes tiveram uma resposta parcial e dois (12%) doentes atingiram doença estável²⁷. Um ensaio de fase I/2 avaliou uma vacina de nanopartículas de mRNA específica para neoantigénios em quatro doentes com cancro gastrointestinal²⁸. Um ensaio clínico de fase I envolve o uso de uma vacina contra o cancro de mRNA baseada em LNPs, que tem como alvo quatro mutações. A vacina de mRNA é administrada em monoterapia ou em combinação com pembrolizumab em doentes com cancro colorretal ou cancro de pâncreas (Tabela I)²⁹.

Tabela I - Ensaios clínicos da aplicação do mRNA no tratamento do cancro.

Classe de RNA	Tumor em Estudo	Veículo Utilizado	Via de Administração	ID Ensaio Clínico	Investigador	Referência Bibliográfica
mRNA	Melanoma em estadio III ou IV	Desprovido de Veículo	Intranodal	NCT02035956	BioNTech	25
mRNA	Melanoma	Desprovido de Veículo	Intranodal	NCT03394937	eTheRNA immunotherapies	26
mRNA	Melanoma	Lipoplexo	Intravenosa	NCT02410733	BioNTech	27
mRNA	Gastrointestinal	LNP	Intramuscular	NCT03948763	Merck Sharp & Dohme	28
mRNA	Tumores Sólidos	LNP	Intramuscular	NCT03313778	Moderna	29

Desta forma, estas estratégias terapêuticas baseadas em mRNA fornecem formas inovadoras de modelar a expressão génica e induzir respostas imunitárias no tratamento do cancro. Tendo em conta as propriedades únicas das moléculas de RNA, os investigadores estão a desenvolver novas abordagens terapêuticas, ainda mais direcionadas e personalizadas, que têm o potencial de revolucionar todo o panorama da terapia do cancro. A resolução dos desafios relacionados com os sistemas de entrega eficientes, a atenuação dos efeitos fora do alvo e a gestão da imunogenicidade serão cruciais para garantir a tradução clínica e o sucesso das terapêuticas baseadas em RNA¹⁰.

2.3. Dificuldades e Limitações na Utilização do mRNA

Apesar de todas as vantagens e perspectivas promissoras para um futuro próximo, existem inúmeras dificuldades e limitações na utilização do mRNA. Desta forma, existem inúmeros desafios na ciência que precisam ainda de ser decifrados, nomeadamente a eficiência de entrega deste tipo de moléculas, a sua estabilidade, a especificidade e a imunogenicidade²⁰.

Uma das grandes dificuldades nas terapêuticas com mRNA são os sistemas de entrega, uma vez que o mRNA na forma livre é suscetível de ser degradado por nucleases. O desenvolvimento de sistemas de entrega eficazes, tais como LNPs, vetores virais ou nanotransportadores à base de polímeros, é crucial para garantir a estabilidade e a entrega direcionada de moléculas de mRNA³⁰.

A estabilidade é outra dificuldade inerente a esta tecnologia, uma vez que as moléculas de mRNA são instáveis devido à sua suscetibilidade perante a degradação enzimática e à vulnerabilidade às enzimas de RNA presentes nos fluidos biológicos. O desenvolvimento de estratégias para aumentar a estabilidade das moléculas de mRNA, nomeadamente

modificações químicas como a incorporação de elementos 5'UTR e 3' UTR, e a otimização do comprimento da cauda poli(A) são essenciais para o sucesso da sua entrega e eficácia terapêutica³⁰.

A especificidade é outro desafio que a ciência tenta ultrapassar todos os dias, uma vez que é fundamental garantir a especificidade das terapêuticas para determinado alvo. As interações indesejadas com mRNA ou outras proteínas do nosso organismo podem ter consequências indesejadas e potencial toxicidade para o organismo. A concepção de moléculas de mRNA com elevada especificidade e incorporação de processos robustos de validação do alvo são vitais para atenuar estes efeitos possíveis fora do alvo³¹.

Por fim, a imunogenicidade é sem dúvida um grande desafio nestas terapêuticas, visto que estas podem desencadear respostas imunitárias no organismo. A gestão da imunogenicidade e a prevenção de reações imunitárias adversas é crucial para a utilização segura e eficaz das terapêuticas baseadas em mRNA³². Tendo em conta que são necessárias repetidas transfecções de mRNA para manter a expressão contínua da proteína de interesse, é necessário garantir que o organismo humano não irá destruir o mRNA administrado. A aplicação do saRNA será crucial neste aspeto, uma vez que com uma menor concentração de saRNA é produzida a mesma quantidade de antigénios, diminuindo o número de doses administradas⁹.

Para que seja possível ultrapassar todos estes desafios, é necessário um esforço contínuo de investigação e desenvolvimento, sendo que estão constantemente a surgir progressos tecnológicos nos sistemas de entrega, nas modificações químicas e nas técnicas de formulação para melhorar a estabilidade, a especificidade e os perfis de segurança destas terapêuticas²⁰. A otimização das sequências, a engenharia química dos nucleótidos, a otimização dos protocolos de transcrição e purificação, e os novos sistemas de entrega *in vitro* ajudaram a ultrapassar alguns dos obstáculos destas terapêuticas⁹. Além disso, é necessária uma estreita colaboração entre investigadores, clínicos e organismos reguladores para garantir testes rigorosos, validação e supervisão regulamentar destas terapias inovadoras¹⁰.

3. Novas Abordagens Terapêuticas com RNA

Após as conquistas atingidas com as vacinas da *Pfizer/BioNTech* e da *Moderna* no combate contra a pandemia do COVID-19, são muitas as empresas que se estão a reinventar para desenvolver novas terapêuticas com *Circular RNA* (*circRNA*), *Self-amplifying RNA* (*saRNA*) e *Trans-amplifying RNA* (*taRNA*). O desenvolvimento extremamente rápido destas vacinas

demonstrou o poder desta terapêutica nas doenças infecciosas, constituindo uma abordagem preventiva³³.

3.1. Diferenças Estruturais e Mecanismos de Ação das Novas Classes de RNA

3.1.1. Circular RNA (circRNA)

O *Circular RNA* (circRNA) é uma classe de RNA de cadeia simples em forma de anel contínuo que tem recebido especial atenção nos últimos anos, embora tenha sido descoberto na década de 1970 e considerado um produto anormal de *splicing* de RNA sem função.³⁴ Pertence à família de RNA não codificante e tem uma estrutura em *loop* formada por ligações covalentes³⁵, sendo que não tem na sua constituição o 5' - cap livre e a cauda poli (A), à qual as enzimas que degradam o RNA se agarram. Desta forma, e seguindo a lógica de Daniel Anderson, bioengenheiro no Instituto de Tecnologia de Massachusetts em Cambridge, como este tipo de RNA não tem extremidades não será digerido tão rapidamente pelas exonucleases e conseqüentemente a expressão proteica será mais robusta e duradoura, o que poderá garantir uma alta estabilidade celular a esta classe de RNA³³. No entanto, o circRNA pode conter locais específicos para as endonucleases³⁶, sendo por isso mais suscetível à degradação por estas enzimas³⁷.

Apesar de ser desconhecida como é que a biogênese do circRNA é regulada, existem várias teorias propostas para explicar como poderá ser formada esta classe de RNA. A primeira teoria centra-se no pré-mRNA, defendendo que durante os fenómenos de *splicing* esta classe de RNA produz o circRNA através de uma reação característica de *back-splicing* que une covalentemente a extremidade 5' a *downstream* com a extremidade 3' a *upstream* (Figura 2). Dá-se o nome de *back-splicing*, uma vez que a ligação fosfodiéster formada tem a ordem inversa dos exões, ao contrário do *splicing* convencional onde a extremidade 5' *upstream* se liga à extremidade 3' *downstream*. Após o *back-splicing* é de notar que o RNA resultante ainda possui exões e intrões, pelo que pode ocorrer *splicing* sobre o circRNA formado. Assim e tal como no processamento de pré-mRNA, na biogênese do circRNA foram detetadas inúmeras sequências de circRNA criadas a partir de um único gene. Esta descoberta evidencia que a síntese desta forma de RNA sofre processos de *splicing* alternativo muito semelhantes aos do *splicing* convencional, justificando assim a abundância de circRNAs diferentes³⁸. Outro mecanismo proposto envolve um precursor de intrões *lariat*, onde a circularização ocorre após o *splicing* de exões e intrões. Este precursor pode ser libertado internamente, levando à remoção da sequência intrónica e à produção de um circRNA³⁹.

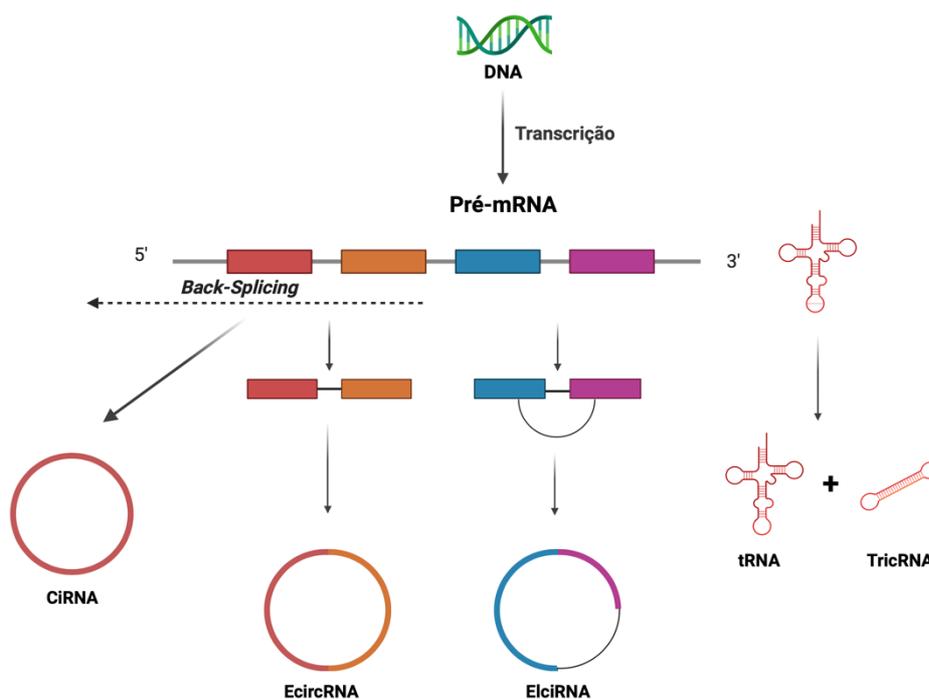


Figura 2 - Teoria defendida para a biogênese do circRNA: o *back-splicing*. Os quatro tipos de circRNA: o circRNA intrônico (CiRNA), o circRNA exônico (EcircRNA), o circRNA exônico-intrônico (ElciRNA) e o circRNA intrônico de tRNA (tricRNA). Adaptado de ³⁵. A figura foi criada com o BioRender.com

No entanto, e dependendo da sequência do genoma, existem 4 tipos principais desta classe de RNA: o exônico, o intrônico, o exônico-intrônico e o tRNA intrônico³⁴ (Figura 2). O circRNA exônico (EcircRNA) é formado por um ou vários exões e representa o corpo principal do circRNA. O circRNA intrônico (CiRNA) é composto apenas por intrões, enquanto o circRNA exônico-intrônico (ElciRNA) é composto por intrões e exões. Por fim, o circRNA intrônico de tRNA (tricRNA) é resultado do *splicing* de intrões pré-tRNA. Os diferentes tipos de circRNA são distribuídos pelos diferentes locais da célula, sendo que o ecircRNA se localiza essencialmente no citoplasma, enquanto o ciRNA e o ElciRNA se localizam no núcleo, o que está em concordância com as diferentes funções biológicas que cada um tem, embora a maioria ainda seja desconhecida³⁵.

Nos últimos anos, e devido à intensa investigação do circRNA, chegou-se à conclusão de que esta seria uma classe de RNA com variadas funcionalidades, nomeadamente na diferenciação celular e na homeostase dos tecidos³⁶. No núcleo, o circRNA compete no processo de *splicing*, uma vez que quando este contém o mesmo exão do gene parental, o circRNA irá competir com o *splicing* linear do pré-mRNA, afetando desta forma o nível de RNAs lineares³⁵. No citoplasma, o circRNA tem outras funções, nomeadamente na ligação às proteínas, visto que alguns circRNAs possuem locais de ligação às proteínas de ligação, funcionando como intermediários para afetar as suas funções³⁵. Por outro lado, e como são moléculas estáveis, podem também funcionar como esponjas de microRNA (miRNA),

eficientes como potencial regulador de genes, sendo que o seu efeito poderá inibir ou proteger o miRNA alvo dependendo do contexto celular⁴⁰. O circRNA é também capaz de codificar e traduzir proteínas, tendo por isso um enorme potencial para o desenvolvimento de vacinas³⁸.

Ao contrário do mRNA linear onde os ribossomos fazem a tradução a partir da extremidade 5', o circRNA tem de recrutar mecanismos independentes de cap⁴¹, nomeadamente através dos locais de entrada do ribossoma interno (IRES) ou pelo local de envolvimento do ribossoma induzido (MIREs) por N6-metiladenosina (m6A)³⁸, para iniciar a tradução e facilitar a produção de proteínas⁴¹. IRESs são elementos do RNA que recrutam os ribossomos para uma região interna do mRNA para o início da tradução, sendo que podem promover a montagem do ribossoma e iniciar a tradução através do recrutamento de diferentes fatores de ação *trans*. O início da tradução mediada por MIREs envolve a metilação de m6A em um ou mais locais do RNA, o que permite o recrutamento do fator de iniciação para dar início à tradução³⁸. No entanto, e tendo em conta que não possui um codão STOP, o circRNA irá continuar ligado ao ribossoma, permitindo assim uma tradução contínua e uma alta expressão de proteínas³⁷, sugerindo que esta classe de RNA tem uma melhor estabilidade e uma imunogenicidade superior às vacinas de mRNA, uma vez que irão provocar respostas imunes mais fortes aquando da administração de doses mais baixas³⁸. Depois da produção de antígenos, é ativado o nosso sistema imunitário para induzir imunidade humoral robusta e imunidade celular eficaz com o auxílio das células dendríticas e respostas robustas de células T citotóxicas, um dos principais alvos da vacinação⁴².

Por fim, o seu potencial como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico é também uma das suas funcionalidades, sendo que são também possíveis alvos terapêuticos na futura medicina personalizada e podem estar envolvidos na tumorigénese. Muitos são altamente conservados e têm padrões de expressão específicos do tecido⁴⁰, no entanto a expressão de circRNA nem sempre se correlaciona com a expressão linear do gene correspondente. Pode então concluir-se que o circRNA não é apenas um subproduto do *splicing*, mas sim um produto do *splicing* alternativo³⁶. Devido a esta panóplia enorme de funções, o circRNA atraiu uma especial atenção, uma vez que tem um enorme potencial como biomarcador de várias doenças, nomeadamente doenças oncológicas⁴⁰.

De forma semelhante ao mRNA linear, a modificação química de nucleótidos específicos e a purificação cromatográfica podem minimizar a imunogenicidade deste RNA e aumentar a taxa de tradução. A circularização pode também melhorar a estabilidade e o tempo de semivida do RNA no ambiente fisiológico³⁷. Desta forma, o fabrico do circRNA é mais rentável, uma vez que o circRNA autocataliza-se com elevada eficiência, visto que não há 5' - cap nem cauda poli(A). O circRNA pode também evitar as respostas imunitárias inatas com

ou sem a adição de nucleótidos modificados, o que permite uma maior poupança de custos. Pode acomodar sequências longas (até 5 ou possivelmente 10 kilobases) e o tempo de semivida é uma grande vantagem o que irá reduzir a frequência de dosagem³⁸.

3.1.2. *Self-amplifying RNA* (saRNA)

O *Self-amplifying RNA* (saRNA) é uma classe única de moléculas de RNA com a capacidade notável de se amplificarem, ou seja, multiplicarem nas células-alvo. Esta classe de RNA tem origem viral, sendo que se aproveita de alguns mecanismos inerentes de certos vírus, como a replicação e a amplificação, para se multiplicar⁴³.

O saRNA é consideravelmente maior do que o mRNA convencional, uma vez que para além de conter os elementos base do mRNA (5' - cap, 5' UTR, ORF, 3' UTR e cauda poli(A)), possui também uma longa região de codificação (ORF) na extremidade 5' que codifica quatro elementos não estruturais proteicos e um promotor subgenómico²¹ (Figura 3). Os genes que normalmente estão a jusante do promotor subgenómico e codificam proteínas estruturais virais são substituídos por genes que codificam os antígenos de interesse, logo a deleção destes genes virais torna o mRNA incapaz de produzir um vírus infeccioso⁴⁴. Os quatro componentes funcionais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) desempenham diferentes funções. O nsP1 é necessário para a associação da membrana plasmática do complexo de replicase e do 5' - cap do RNA viral e o nsP2 é a helicase de RNA e a protease viral no processamento das poliproteínas²¹. O nsP3 medeia as múltiplas interações vírus-hospedeiro-proteína e o nsP4 é a RNA polimerase dependente de RNA (RPDR)⁴⁵. Estes quatro componentes constituem o complexo polienzimático replicase que codifica as proteínas responsáveis por iniciar e mediar o processo de replicação, sendo que desempenham um papel fundamental no reconhecimento dos elementos de ação *cis* RNA⁹, que correspondem predominantemente a UTRs, localizadas na extremidade 5', na extremidade 3' e na região de junção entre as ORFs não estruturais e estruturais²¹. Estes elementos servem como locais de reconhecimento para as replicases virais, sendo essenciais para que o processo de replicação prossiga de forma eficiente, uma vez que fornecem os sinais e as estruturas necessárias que permitem às proteínas da replicase se ligarem e iniciarem a replicação⁴⁶.

O alfavírus e o flavivírus são alguns dos exemplos de vírus que irão originar esta classe de RNA. O saRNA originário do alfavírus contem uma ORF separada a montante do gene de interesse que codifica todas as proteínas replicase. Por outro lado, no saRNA originário do flavivírus, as proteínas replicase são codificadas numa única ORF a jusante do gene de interesse³⁶.

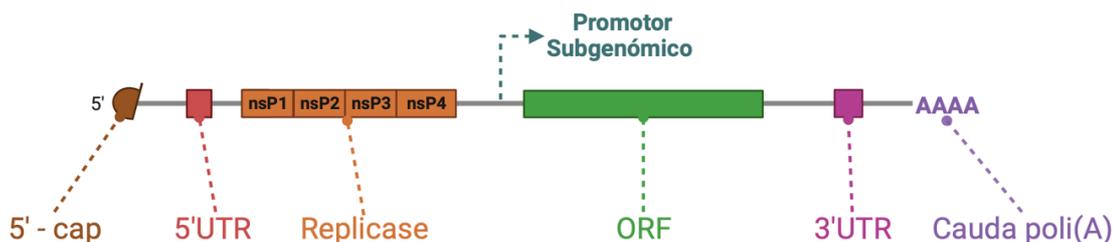


Figura 3 - Elementos estruturais essenciais do saRNA: região 5' - cap, região 5' não traduzida (5'UTR), uma região de codificação que codifica quatro elementos não estruturais proteicos que constituem a replicase e um promotor subgenômico, uma região de codificação (ORF), a região 3' não traduzida (3'UTR) e uma cauda poli(A). Adaptado de ²¹. A figura foi criada com o BioRender.com

Após a produção das proteínas de replicase viral, e o reconhecimento e ligação destas replicases aos elementos de ação *cis* RNA, o processo de replicação será iniciado. O complexo RPDR encontra-se ligado à membrana plasmática, estando desta forma oculto do sistema imunitário da célula hospedeira⁴⁷. Quando o saRNA (cadeia positiva) é entregue, a replicase utiliza-o como modelo, formando o saRNA complementar (cadeia negativa), que atua como um modelo para a replicase sintetizar mais saRNA de fita positiva ou RNA da proteína de interesse³⁷. Este mecanismo proporciona um sistema de amplificação, uma vez que produz níveis altos e sustentados da expressão de antígeno em relação ao mRNA convencional. Desta forma, este é um dos fatores que justifica as doses mais baixas de saRNA utilizado nas vacinas assim como uma menor frequência do processo de vacinação, tornando o saRNA uma ferramenta atrativa para aplicações terapêuticas⁴⁸.

A auto-amplificação de RNA resulta na exaustão celular, estimulação do sistema imunitário e numa resposta antiviral da célula hospedeira resultando na sua apoptose. Desta forma, este processo mimetiza uma infecção viral e leva ao aumento das respostas das células B e T. Paralelamente ao processo de auto-amplificação, o saRNA desencadeia uma estimulação do sistema imunitário inato, sendo que esta detecção é mediada por recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) que detetam padrões moleculares associados a agentes patogénicos conservados (PAMPs), resultando na indução de respostas inflamatórias e defesas inatas do hospedeiro. Além disso, a detecção de saRNA por PRRs expressos por APCs, particularmente as células dendríticas, leva à ativação de respostas imunes adaptativas²¹. Desta forma, a utilização de saRNA garante a indução de um nível inicial elevado de produção de antígeno e uma imunogenicidade sustentada a partir do saRNA com uma pequena quantidade de entrada inicial de mRNA, tornando assim este formato de fármaco um instrumento potente para a vacinação profilática e terapêutica⁹.

Estudos demonstram que são precisos 64 vezes menos material para o desenvolvimento de uma vacina de saRNA em comparação com as vacinas com mRNA convencional, para esta alcançar o mesmo resultado na produção de antígenos. Desta forma, esta é uma abordagem menos dispendiosa e mais simples⁴⁷.

Em geral, a característica que define o saRNA reside na sua capacidade de se replicar e amplificar dentro das células-alvo. Esta característica única, juntamente com a versatilidade na conceção e o potencial para a medicina personalizada, posiciona o saRNA como uma ferramenta terapêutica promissora no campo do tratamento de várias doenças. Os esforços de investigação e otimização em curso centram-se no aperfeiçoamento dos sistemas de entrega de saRNA, na maximização dos níveis de expressão da proteína e na elucidação dos seus mecanismos de ação para aproveitar todo o seu potencial terapêutico⁴⁷.

3.1.3. *Trans-amplifying RNA* (taRNA)

Tendo em conta que a molécula de saRNA é uma molécula muito longa, devido principalmente aos 4 componentes que constituem a replicase, a sua produção poderá ser dificultada, assim como a entrega eficiente e o benefício de uma possível redução de dose poderá diminuir⁴⁶. Tendo em conta este aspeto, e com o objetivo de facilitar e acelerar a produção das vacinas de RNA, surgiu o *Trans-amplifying RNA* (taRNA), uma versão avançada e otimizada da tecnologia do saRNA⁴⁷.

O taRNA é constituído por dois RNAs que se encontram separados, um mRNA otimizado não replicante que codifica a replicase viral e um *transreplicon* (TR) codificador do antígeno de interesse que é amplificado pela replicase co-transfectada (Figura 4)²¹. Consequentemente, a replicase pode amplificar simultaneamente numerosos mRNAs que codificam diferentes proteínas, tornando mais flexível o desenvolvimento de mRNAs terapêuticos⁹. Após a tradução, a replicase amplifica o TR que codifica o antígeno, exigindo assim quantidades mínimas de TR para imunização. A amplificação de TR pela replicase segue um mecanismo complexo mediado por promotores genómicos e subgenómicos, onde apenas genes subgenómicos são traduzidos em proteínas terapêuticas. Essa complexidade do taRNA requer simplificação e otimização com um *design* racional para uma evolução direcionada⁴⁹. Por outro lado, a replicase fornecida em *trans* pode ser produzida em grandes quantidades e armazenada para uma futura entrega de baixas quantidades de TR específico do alvo⁵⁰.

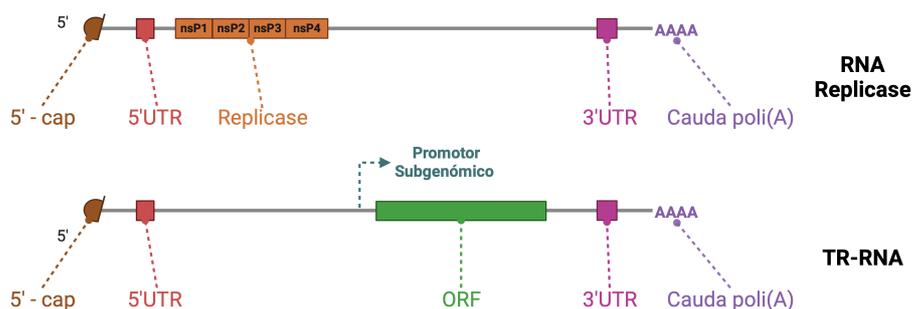


Figura 4 - Elementos estruturais essenciais do taRNA: mRNA otimizado não replicante que codifica a replicase viral e um *transreplicon* (TR) codificador do antígeno de interesse que é amplificado pela replicase co-transfectada. Adaptado de ²¹. A figura foi criada com o BioRender.com

Esta abordagem tende a ter um perfil de segurança melhor do que as vacinas saRNA normais, o que se pode dever ao facto de utilizar duas construções de RNA diferentes que reduzem ainda mais a possibilidade de partículas virais modificadas serem transferidas para células hospedeiras⁵¹. Para além deste aspeto, garantem uma produção rápida e económica de um grande número de doses de vacinas⁵².

No entanto, o potencial desta tecnologia no combate de doenças infecciosas e em doenças oncológicas através da utilização de vacinas é bastante limitado⁵⁰, uma vez que é necessário produzir dois RNAs assim como é necessária uma formulação para entrega deste RNA *in vivo*⁴⁵. Desta forma, espera-se que sejam desenvolvidos novos estudos relativos a este tipo de RNA⁵⁰.

3.2. LIMITAÇÕES e MELHORIAS DAS NOVAS TERAPIAS DE RNA

A investigação e desenvolvimento das novas terapias de RNA são particularmente promissoras, no entanto, e assim como o mRNA, é necessário enfrentar desafios como a especificidade, a imunogenicidade, a otimização do sistema de entrega e os perfis de segurança a longo prazo para concretizar plenamente o potencial destas terapias⁹.

São vários os desafios associados à utilização de circRNA, muitos já descobertos e muitos outros por descobrir. A especificidade de uma terapêutica é essencial para evitar que a mesma provoque efeitos fora do alvo, e consequentemente efeitos adversos. O direcionamento do circRNA deve ser preferencialmente exercido sem perturbar a expressão de outras RNAs. Estudos feitos relativamente aos padrões de expressão celular de ciRS-7 no cancro do cólon, identificaram a completa ausência de ciRS-7 em células cancerígenas, assim

como a alta expressão em células estromais dentro do microambiente tumoral, o que fornece orientação para a seleção de uma célula-alvo quando se utiliza o ciRS-7 no tratamento do cancro do cólon, direcionando esta terapêutica para um único alvo³⁷.

Por outro lado, o ponto-chave para o sucesso desta terapêutica é evitar a introdução de circRNA estranho (RNA sintético ou exógeno), visto que estes possuem poucas proteínas associadas ao RNA, assim como podem induzir uma rápida regulação positiva de vários genes associados à inflamação. Desta forma, é de extrema importância explorar o mecanismo de distinção entre RNAs³⁷, no entanto, a investigação é atrasada por diversos fatores, nomeadamente na capacidade de os detetar, uma vez que ensaios convencionais de PCR quantitativa de transcriptase reversa (RT-qPCR) não distinguem o RNA circular do RNA linear, caso este seja utilizado como modelo para o desenho de um *primer*. Desta forma, o *Northern Blotting* é considerado uma técnica preciosa para a validação de novos circRNAs, uma vez que nenhuma transcrição reversa e etapas de amplificação fazem parte do protocolo. A Hibridização *in Situ* é outra técnica que poderá ser utilizada para futuras pesquisas no cancro para a quantificação da expressão de circRNA, uma vez que fornece informações espaciais sobre circRNA específicos e é compatível com amostras de tecido embebidas em parafina fixadas em formalina, permitindo a distinção entre a expressão de circRNA de células cancerígenas, da expressão de células não malignas do tumor³⁶.

O sistema de entrega utilizado para administrar com segurança o circRNA projetado *in vivo* é também um desafio importante. Os exossomas têm uma estrutura em bicamada lipídica que pode proteger o RNA contra a degradação enzimática e garantir a sua concentração efetiva, além de que o seu tamanho reduzido pode facilitar a sua absorção nas células tumorais⁵³. Os exossomas modificados podem ser uma abordagem eficaz, uma vez que contêm circRNA modificados e têm maior afinidade para as células malignas. No entanto, pode haver a possibilidade de estes atingirem células saudáveis, levando à utilização de nanopartículas de ouro, por exemplo, para diminuir esta possibilidade. Foram feitos estudos com nanopartículas de ouro para administrar circ-Foxo3 em ratos para inibir a progressão de um tumor³⁷.

O saRNA e o taRNA são também tecnologias com inúmeras vantagens nomeadamente na obtenção de uma elevada expressão de antigénios, assim como fortes respostas imunitárias com quantidades mínimas de mRNA. Para além de que o taRNA utiliza um vetor bipartido, simplificando assim o protocolo de transfecção⁵⁴. No entanto, e como a classe anterior, estes também têm inúmeros desafios que precisam de ser ultrapassados para que estas tecnologias possam ser utilizadas num futuro próximo como terapêuticas contra inúmeras patologias.

A estimulação do sistema imune inato por vacinas de saRNA transcritas *in vitro* é um tópico complexo que ainda requer estudos adicionais⁴⁶. A imunização deve idealmente provocar uma resposta imune específica do antigénio, no entanto, atualmente não está claro se a ativação imune inata periférica de RNAs transcritos *in vitro* aumenta ou compromete essa resposta, uma vez que o próprio vetor pode provocar uma resposta imune indesejável.⁵⁵ Por outro lado, e tendo em conta que estas terapias provocam uma resposta imune mais forte comparativamente ao mRNA convencional, esta potencialidade pode originar o aparecimento de efeitos adversos, incluindo febre e inflamação³⁰. Desta forma, melhorar a reação de transcrição *in vitro* e a purificação por cromatografia líquida pode reduzir a estimulação imune não intencional por subprodutos, incluindo RNAs de cadeia dupla (dsRNAs)⁴⁶. Para vacinas de saRNA, os benefícios imunogénicos de purificação podem ser menos significativos do que para mRNAs convencionais, uma vez que a purificação pode remover dsRNAs inespecíficos, no entanto a formação de novos intermediários dsRNA é inevitável durante a auto-amplificação⁴⁵. Por outro lado, como o saRNA usa fatores da célula hospedeira para a replicação do mRNA, a adição de nucleótidos modificados pode ser menos valiosa, uma vez que os nucleótidos adicionados seriam perdidos durante a amplificação⁴⁷. Desta forma, uma das abordagens práticas para melhorar a tradução de vacinas de saRNA é a otimização das porções 5' UTR e 3' UTR, mimetizando o que ocorre naturalmente no alfavírus, visto que se formam estruturas secundárias dentro do genoma de RNA para contornar os processos normais de tradução da célula hospedeira e para evitar respostas imunológicas. Por fim, a sequência que constitui a replicase pode também ser otimizada⁹.

A produção e ampliação das vacinas de saRNA pode também ser uma limitação, uma vez que embora estas vacinas tenham a vantagem de serem sintetizadas rapidamente, fabricá-las em grande escala pode ser um desafio, especialmente em termos de manutenção de controlo de qualidade. Para além deste fator, a molécula de saRNA é bastante longa, o que poderá também dificultar a sua fabricação, assim como poderá interferir com o custo de produção⁵⁶.

Por fim, pode surgir um desafio a nível regulamentar uma vez que como estas são tecnologias bastante recentes, as vias regulatórias podem não estar totalmente estabelecidas e esclarecidas, o que pode levar a incertezas no processo de aprovação⁵⁶.

4. Aplicação da Nanotecnologia na Entrega das Novas Terapias de RNA

As novas terapias de RNA têm-se mostrado bastante promissoras no tratamento de doenças oncológicas, não só pela sua estrutura e mecanismo de ação, mas também pelas

vantagens que apresentam relativamente à produção e ao facto de serem mais direccionadas para o alvo⁵⁷. No entanto, o maior desafio destas terapêuticas continua a ser a seleção e otimização dos sistemas de entrega destas tecnologias, para consequentemente se conseguir uma entrega eficiente às células-alvo⁵⁸. Para alcançar os efeitos terapêuticos, as moléculas de RNA devem atingir as células-alvo específicas e produzir as proteínas de interesse suficientes. No entanto, a entrega direccionada permanece ser desafiadora para os sistemas de entrega de RNA, destacando a necessidade de materiais de entrega de RNA seguros e eficazes⁵⁷.

Uma variedade de materiais foi desenvolvida para entrega de mRNA, incluindo lípidos, polímeros e derivados de proteínas⁵⁷. Em particular, as nanopartículas lipídicas (LNPs) foram minuciosamente investigadas e entraram em sucesso na clínica para a entrega destas moléculas, uma vez que conferem biocompatibilidade favorável, biodegradabilidade e capacidade natural de penetração celular⁵⁹.

A nanotecnologia tem mostrado ser um grande aliado para o sucesso destas terapêuticas com recurso às várias classes de RNA. Nas últimas três décadas, a nanotecnologia tem sido alvo de uma investigação exaustiva com o objetivo de poder utilizar esta plataforma juntamente às terapias com RNA⁶⁰. Desta forma, a nanotecnologia apresenta inúmeras vantagens nomeadamente a capacidade de evitar a opsonização, a acumulação nos tumores por meio do aumento da permeabilidade e efeito de retenção, o direccionamento para as células-alvo e a modulação do sistema imunitário⁶⁰. Vários estudos foram realizados com a utilização de RNA desprovido de veículo, no entanto, existem predominantemente três principais plataformas de entrega: nanopartículas de origem polimérica, nanopartículas de origem lipídica e nanopartículas inorgânicas²¹.

4.1. Utilização de Nanosistemas na Encapsulação de RNA

4.1.1. Classes de RNA Desprovidas de Veículo

Estudos realizados demonstram que o saRNA desprovido de veículo foi utilizado com sucesso para imunizações *in vivo* contra o subtipo C do HIV-1, Influenza e vírus Zika⁴⁵, no entanto, demonstraram também que era necessária uma dose necessária significativamente superior para induzir uma resposta humoral e/ou celular, relativamente a outros estudos realizados com saRNA encapsulado. Beissert *et al.* imunizou murganhos através da utilização do taRNA, composto por 20 µg de replicase de doses variadas (0,05 a 31,25 µg) do antigénio da hemaglutinina (HA), e observou uma proteção completa contra o vírus Influenza. Outros estudos utilizam a técnica de eletroporação, ou seja, a aplicação de breves impulsos elétricos para romper transitoriamente as membranas celulares⁶¹, permitindo a entrada do saRNA nas

células, para administrar uma dose de 1 ou 10 µg de saRNA por via intramuscular, sendo que observaram a produção de anticorpos moderados e respostas celulares contra as proteínas precursoras da membrana e do envelope do vírus Zika⁵⁶. Todos estes estudos demonstram que apesar de ser possível a indução de respostas imunes através da utilização do saRNA “despido”, a dose necessária para este efeito elimina qualquer vantagem de utilizar o saRNA sem qualquer veículo⁴⁵. Curiosamente alguns estudos demonstram que a eletroporação de saRNA aumentou significativamente a cinética de expressão comparativamente com o saRNA “nu” ou formulado com LNPs, uma vez que esta técnica induz uma resposta imune inata limitada após a injeção intradérmica⁶².

4.1.2. Nanopartículas de Origem Polimérica

Mecanismos de distribuição eficientes são necessários com urgência, tendo sido por esse mesmo motivo, desenvolvidos vários nanomateriais com o objetivo de proteger o RNA contra a degradação extracelular, entregar o RNA às células alvo de forma eficiente e por último promover o vazamento endossomal subsequente à absorção celular⁵⁷. As nanopartículas de origem polimérica podem ser utilizadas como transportadores, sendo que vários estudos consideram que as nanopartículas metálicas são ferramentas particularmente importantes e aplicáveis⁶³.

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em polímeros naturais e conjugados poliméricos sintéticos. Os polímeros naturais, como o quitosano, composto por N-acetil-dglucosamina e d-glucosamina, poli-l-lisina, ocorre na natureza e é produzido por todos os organismos vivos. As vantagens destas nanopartículas são a boa compatibilidade e biodegradabilidade, assim como o baixo custo de produção. Relativamente aos polímeros sintéticos, destacam-se o poli(dl-láctido-coglicólido) (PLGA), o álcool polivinílico (PVA), o polietilenoglicol (PEG), o ácido poli-l-láctico (PLA)⁶ e a polietilenoimina (PEI), um polímero catiónico utilizado na entrega de ácidos nucleicos, composto por cadeias lineares ou ramificadas que podem facilmente atrair e transportar ácidos nucleicos, tendo um efeito de esponja de prótons que pode facilitar a libertação endossomal⁵⁷. São estes os polímeros mais usados na entrega de RNAs devido à sua alta estabilidade, boa compatibilidade e biodegradabilidade. Para além deste aspeto, estes polímeros sintéticos são fáceis de funcionalizar, ou seja, é possível adicionar ligandos a estas nanopartículas para estas serem direcionadas para certos alvos terapêuticos, assim como responderem a vários estímulos químicos, biológicos e físicos⁶. Um exemplo deste ligando é o ácido S,S-2[3-[5-amino-1-carboxipentil]ureido]pentanodióico (ACUPA)⁵⁹. No entanto, alguns destes polímeros

sintéticos, por exemplo o PLGA, não podem ser aplicados diretamente na entrega de RNA devido à ausência de unidade catiónicas, pois esta ausência irá originar uma baixa interação eletrostática entre os polímeros e o RNA⁶. Um método para ultrapassar este problema é a modificação destes polímeros com a utilização de outros polímeros catiónicos, como por exemplo a PEI, ou a combinação com polímeros catiónicos em nanoestruturas²¹.

4.1.3. Nanopartículas de Origem Lipídica

Em 1976, os ácidos nucleicos foram encapsulados em partículas poliméricas. Anos mais tarde, a entrega de mRNA foi demonstrada através da utilização de lipossomas⁵⁵ (Figura 5). Os lipossomas são constituídos por bicamadas formadas por fosfolípidos esféricos e colesterol, sendo que estas partículas apresentam bom direcionamento e baixa toxicidade. No seu interior aquoso, podem encapsular fármacos hidrofílicos, enquanto os fármacos lipofílicos podem ser encapsulados na bicamada lipídica⁶⁴. Mais tarde foram desenvolvidos os lipoplexos (Figura 5), sendo estes os primeiros sistemas de entrega constituídos por lípidos a ser investigados e utilizados com sucesso na entrega de mRNA às células-alvo⁶⁵, protegendo o RNA da degradação por complexação e condensação, apesar de este estar exposto à superfície do lipoplexo⁴⁸. No entanto, estas partículas demonstraram ter alta instabilidade, uma eficácia de transfecção relativamente baixa e uma composição personalizável pobre, visto que muitas vezes são formulados com excesso de cargas positivas para promover a ligação ao RNA e para também facilitar a interação com os fosfolípidos aniônicos da membrana plasmática e consequentemente promover a endocitose⁵⁷.

Estas desvantagens limitaram a aplicação dos lipoplexos, mudando assim o interesse dos investigadores para a utilização das LNPs (Figura 5), uma vez que estas demonstram ter uma estabilidade superior, plasticidade estrutural e entrega aprimorada⁵⁷, sendo que estas são as nanopartículas com maior percentagem em lípidos catiónicos ou ionizáveis e menor percentagem em fosfolípidos⁶⁶. As LNPs são formulações lipídicas de tamanho nano (~100 nm) projetadas para proteger as cargas úteis do RNA da degradação e permitir a entrega eficiente às células-alvo³³. Estes nanoportadores são constituídos por fosfolípidos, moléculas anfifílicas, sendo que estas contêm dois domínios: um grupo de cabeça polar e uma região de cauda hidrofóbica⁶⁴, possuindo um interior lipídico líquido (LNPs) ou sólido (SNPs)⁵⁶. Desta forma, a morfologia das LNPs não é como a morfologia de um lipossoma, uma vez que os lipossomas são caracterizados por uma bicamada lipídica envolvendo um núcleo aquoso⁵⁷, enquanto estas são formadas por apenas uma única bicamada lipídica⁴⁰ e um núcleo lipídico homogêneo, onde os lípidos são organizados em micelas invertidas ao redor das moléculas de RNA⁶⁷. Vários

tipos de lípidos foram estudados para serem utilizados na entrega de mRNA, nomeadamente os lípidos catiónicos, os lípidos ionizáveis e outro tipo de componentes lipídicos⁵⁵.

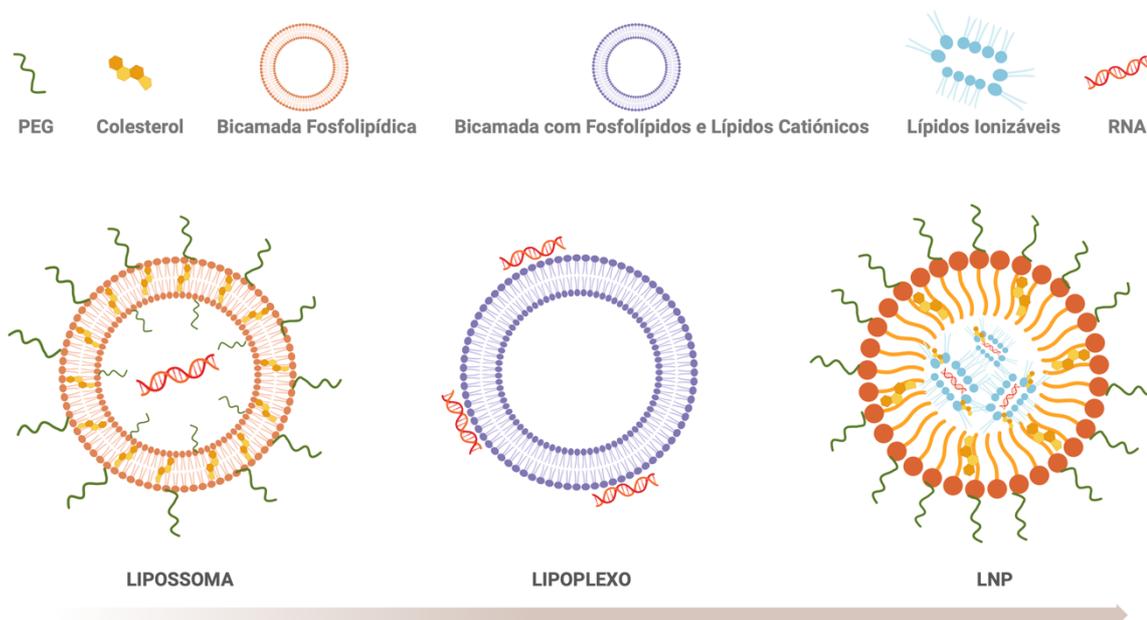


Figura 5 - Ilustração simplista de alguns sistemas de entrega de origem lipídica pela sua ordem de descoberta, sendo que os primeiros são os lipossomas, seguindo-se dos lipoplexos e das LNPs. Todas as estruturas são estruturas propostas e podem variar dependendo da composição lipídica e da carga de ácidos nucleicos. A ilustração destaca a diminuição de colesterol e o aumento de PEG e de lípidos catiónicos ou ionizáveis, introduzida para facilitar o encapsulamento ativo de ácidos nucleicos. Adaptado de ⁶⁶. A figura foi criada com o BioRender.com

4.1.3.1. Lípidos Catiónicos

Os lípidos catiónicos são moléculas anfífilas, possuindo uma cabeça polar com um grupo com cargas permanentemente positivas e uma cauda hidrofóbica⁶⁴. São exemplos destes lípidos o 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamônio-propano (DOTMA), um lípido de amónio quaternário e combinado com o lípido 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE)⁶⁸. O 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP), um análogo biodegradável do DOTMA, foi também estudado para ser utilizado na entrega de RNA. Estes tipo de lípidos podem ser utilizados nas formulações, sozinhos ou combinados com outros materiais⁴³. São inúmeros os exemplos existentes onde é evidenciada a utilização destes lípidos, nomeadamente a utilização de DOTMA na conceção de lipoplexos de mRNA direcionados para o baço no desenvolvimento de uma vacina contra o cancro sistémico, sendo que a mesma formulação foi também utilizada no tratamento da encefalomielite autoimune⁵⁷.

4.1.3.2. Lípidos Ionizáveis

Os lípidos ionizáveis são protonados em ambientes com pH ácido, o que os torna carregados positivamente, no entanto permanecem neutros em pH fisiológico⁴³. Esta sensibilidade ao pH, característica deste tipo de lípidos, é benéfica na entrega de RNA *in vivo*⁶⁸. Dentro dos endossomas, nos quais o pH é menor do que no ambiente extracelular, estes lípidos são protonados e por isso carregados positivamente, o que pode promover a destabilização da membrana celular e facilitar a libertação do conteúdo endossomal⁶⁴. São exemplos deste tipo de lípidos o 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLin-DMA), utilizado na entrega de siRNA, assim como o (6Z,9Z,28Z,31Z)-Heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimetilamino)butanoato (DLin-MC3-DMA), um dos componentes chave na entrega do Onpattro, o primeiro medicamento com siRNA aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA)⁶⁸. A utilização de lípidos ionizáveis zwitteriônicos pode também ser aplicada na entrega de RNA, tendo a mesma capacidade para escapar dos endossomas e levando à expressão da proteína de interesse e à edição do genoma *in vivo*⁵⁷. Além de funcionar como componentes de entrega, os lípidos podem também ter um efeito terapêutico sinérgico com as proteínas codificadas do RNA. Um dos exemplos estudado é a utilização de lípidos com uma amina heterocíclica como grupo principal, sendo que esta pode ativar a via de sinalização do estimulador dos genes de interferão (STING) com células dendríticas. Estes lípidos, componentes de uma vacina de mRNA, induzem potentes respostas de linfócitos T citotóxicos e inibem o crescimento tumoral em modelos de murganhos⁴³. Lípidos conjugados com paclitaxel encapsulado com mRNA supressor de tumor podem ser aplicados na quimioterapia e na terapia génica como tratamento do cancro da mama triplo positivo⁶⁸.

4.1.3.3. Componentes Lipídicos

Para além desta duas classes de lípidos, as formulações lipídicas de nanopartículas normalmente contêm outros componentes lipídicos, nomeadamente fosfolípidos (fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina), colesterol ou lípidos funcionalizados como o PEG. Os fosfolípidos melhoram as propriedades dos nanotransportadores lipídicos, como a estabilidade das partículas, eficácia de entrega, tolerabilidade e biodistribuição. Por exemplo, a 1,2-diestearoil-snglicero-3-fosfocolina (DSPC), uma fosfatidilcolina com caudas saturadas, tem uma temperatura de fusão de 54°C e uma geometria cilíndrica que permite que as moléculas de DSPC formem uma fase lamelar, que estabiliza a estrutura das LNPs⁶⁸. O DOPE é outro exemplo de uma fosfoetanolamina com duas caudas insaturadas, com uma temperatura de fusão de 30°C e uma forma cónica, sendo que este componente tende a

adotar uma estrutura hexagonal invertida, o que destabiliza as membranas endossomais e permite o escape do conteúdo endossomal⁶⁶. O colesterol é um dos componentes mais comuns nestas formulações, uma vez que aumenta a estabilidade das partículas modulando a integridade e rigidez da membrana. A geometria molecular dos derivados de colesterol pode afetar ainda mais a eficácia de entrega e a biodistribuição dos nanotransportadores⁵⁷. Por exemplo, análogos de colesterol com C-24 alquilfitoesteróis aumentam a eficácia de entrega *in vivo* deste tipo de formulações. Desta forma, o comprimento das caudas hidrofóbicas dos análogos e colesterol, a flexibilidade dos anéis de esteróis e a polaridade dos grupos hidroxilo afetam a eficácia de entrega⁶⁸. Por fim, o PEG pode ter inúmeros efeitos nas propriedades destes veículos lipídicos, sendo que a quantidade de PEG pode afetar o tamanho das partículas e o potencial zeta, características importantes para a entrega eficaz do RNA⁹. Contribuiu para a estabilidade das partículas, diminuindo a agregação das mesmas, sendo que certas modificações na molécula de PEG podem prolongar o tempo de circulação sanguínea das nanopartículas, reduzindo a depuração do sangue nos rins e o sistema de fagocitário mononuclear⁵⁷. Por outro lado, o PEG torna as nanopartículas invisíveis aos fagócitos, aumentando o seu tempo de circulação, sendo por isso chamadas às nanoestruturas PEGuiladas, nanopartículas “Stealth”⁶⁸. O PEG pode também ser utilizado para conjugar ligandos específicos para uma entrega direcionada. A extensão dos diferentes efeitos depende das proporções e propriedades da própria molécula de PEG, como por exemplo a massa molar e o comprimento lipídico⁶⁹. Um exemplo deste efeito é a utilização de PEG₂₀₀₀-DMG e PEG₂₀₀₀-DSG, dois PEG-lípidos neutros, sendo que é o comprimento das suas cadeias saturadas que os distinguem com C₁₄ e C₁₈, respetivamente. As formulações contendo PEG₂₀₀₀-DMG, ou seja, com uma cadeia saturada mais curta, têm tempos de circulação mais curtos e maior eficácia de entrega *in vivo* do que as formulações com PEG₂₀₀₀-DSG. Essa diferença pode dever-se à dissociação mais rápida do PEG₂₀₀₀-DMG, o que pode beneficiar a captação celular e o escape endossomal das nanopartículas³⁹. Por fim, as LNPs PEGuiladas têm a capacidade de evitar a opsonização por proteínas séricas e a deteção pelo sistema reticuloendotelial (RES)⁵⁷.

Podemos concluir que as nanopartículas à base de lípidos oferecem uma abordagem não viral, sendo muito utilizadas uma vez que são compostas por componentes da mesma natureza dos componentes da membrana celular, facilitando a entrega às células-alvo. Para além deste aspeto, estas nanoestruturas apresentam inúmeras vantagens nomeadamente uma boa compatibilidade, biodegradabilidade e uma fácil preparação⁶. Desta forma, estes veículos têm sido utilizados para encapsular vários tipos de RNA, sendo que alguns estudos colocaram a hipótese de que o saRNA seria mais difícil de encapsular devido ao seu tamanho maior, no entanto, concluiu-se que o saRNA pode ser na mesma encapsulado em LNPs⁷⁰.

4.1.4. Nanopartículas Inorgânicas

O desenvolvimento de nanopartículas inorgânicas na terapia contra o cancro é notável, uma vez que estas nanopartículas possuem propriedades físico-químicas distintas, assim como possuem funções de diagnóstico e terapêuticas⁵⁹. São exemplos destas nanopartículas inorgânicas os nanomateriais de sílica mesoporosas, nanotubos de carbono e nanoestruturas metálicas, como o óxido de ferro, a prata e o ouro. Estas nanopartículas inorgânicas são sintetizadas por polímeros biodegradáveis e partículas inorgânicas. Consequentemente, as propriedades destas nanopartículas são fáceis de controlar, sendo que a modificação de superfície, a boa reprodutibilidade e a fácil absorção celular são algumas das suas vantagens. No entanto, o nível de degradabilidade de todos os materiais inorgânicos ainda não foi totalmente determinado, logo a toxicidade pode ser um problema destas nanopartículas⁶.

As nanopartículas de óxido de ouro-ferro (GIONS) melhoram a detecção da progressão do tumor pela combinação de técnicas de tomografia computadorizada, ressonância magnética, imagem fotoacústica e espectroscopia Raman aprimorada de superfície. Para além deste aspeto, estas representam uma espécie de agentes fototérmicos que danificam eficientemente as células malignas por ablação fototérmica. A superfície GION pode ser funcionalizada através da ligação covalente com tios e oligonucleotídeos que se ligam a RNAs terapêuticos para o transporte para as células malignas danificadas, sendo que desta forma, apresentam um efeito sinérgico na terapia contra o cancro⁵⁹.

As nanopartículas de prata podem ser sintetizadas facilmente como materiais uniformes com baixa dispersão de tamanho, sendo prontamente funcionalizadas por meio de modificação com diferentes monocamadas, multifuncionais, frações e agentes de direcionamento⁷⁰. Devido às suas propriedades físico-químicas e biofuncionais únicas, como a atividade anti-inflamatória, antiangiogénese, antiviral, antifúngica e antibacteriana, as nanopartículas de prata desempenham um papel importante no desenvolvimento e implementação de novas estratégias biomédicas⁷¹. Além disto, a sua toxicidade e biodistribuição *in vivo* podem ser controladas otimizando o tamanho da partícula e a funcionalidade da superfície⁵⁷. No entanto, é necessário ter alguma atenção à sua alta toxicidade e baixa estabilidade, apesar de ambas as desvantagens possam ser ultrapassadas com modificações apropriadas⁷¹.

4.2. Mecanismo de Entrega das Novas Terapias de RNA

Por mais de duas décadas, os investigadores têm tentado resolver os desafios relacionados com a aplicação terapêutica de RNAs, nomeadamente questões relacionados com a distribuição intracelular, a estabilidade e estimulação de uma resposta imune⁵⁷. Para funcionar *in vivo*, os nanotransportadores precisam de superar múltiplas barreiras extracelulares e intracelulares⁶⁸.

Depois do RNA ser protegido da degradação pelas nucleases dos fluidos biológicos, esta formulação deve evitar a eliminação por filtração glomerular renal após administração sistémica, sendo que a incorporação com PEG irá diminuir esta depuração renal⁶⁸.

De seguida, os sistemas lipídicos de nanopartículas-RNA precisam de atingir os tecidos alvo, para de seguida ocorrer a internalização pelas células-alvo⁶⁸. Existem dois modelos de direcionamento de fármacos: o ativo e o passivo. O direcionamento passivo entende que a razão por detrás do direcionamento dos fármacos é a vascularização deficiente do tecido tumoral com um crescimento rápido e uma drenagem linfática defeituosa que contribui para a retenção das nanopartículas. Estas nanopartículas passam por vasos sanguíneos hiperpermeáveis, e devido ao seu reduzido tamanho, acumulam-se preferencialmente no local do tumor devido ao efeito EPR. O direcionamento ativo consiste na interação da nanopartícula formulada com um ligando, com os recetores expostos à superfície das células-alvo, o que auxilia a sua acumulação intracelular por meio de endocitose mediada por recetores. Logo, estas nanopartículas estão direcionadas para um determinado alvo². Além disso, a biodistribuição direcionada de formulações lipídicas pode ser melhorada por meio de acidificação e otimização da nanopartícula, nomeadamente através da incorporação de anticorpos no revestimento das nanopartículas para entregar as moléculas de RNA a linfócitos inflamatórios e células tumorais positivas para o recetor de fator de crescimento epidérmico⁶⁸. A seletividade de órgãos pode também ser atingida ajustando as proporções de componentes lipídicos da formulação em causa⁵⁵.

Quando as nanopartículas atingem as células-alvo, estas podem ser internalizadas por vários mecanismos, nomeadamente macropinocitose e endocitose. A via endocítica depende das propriedades da nanopartícula e do tipo de célula. Após ocorrer a internalização das nanopartículas, estas são posteriormente incorporadas em endossomas⁹, sendo que o posterior escape endossomal é crucial para a entrega efetiva do RNA [29], sendo este o último passo da entrega destas nanopartículas. Embora o mecanismo ainda não tenha sido totalmente compreendido, a característica mais notável da via endossomal é a mudança do gradiente de pH⁵⁶. Por esta razão, a principal abordagem para facilitar o escape endossomal das

nanoestruturas tem sido torná-los suscetíveis à acidificação dos endossomas. Entre as várias estratégias para induzir o escape endossomal das nanoestruturas, vários cenários são amplamente aceites: a destabilização da membrana endossomal e a rutura osmótica dos endossomas⁷².

De modo geral, considera-se que os materiais à base de lípidos têm uma maior propensão para destabilizar a membrana⁷², uma vez que os lípidos carregados positivamente podem facilitar a interação eletrostática e a fusão com as membranas endossomais carregadas negativamente, resultando desta forma, no vazamento das moléculas de RNA para o citoplasma da célula, e conseqüentemente a produção da proteína de interesse⁵¹. Todo este processo pode ser facilitado através da otimização dos valores de pKa dos lípidos ionizáveis. Por outro lado, as propriedades das caudas lipídicas pode afetar o escape endossomal, nomeadamente com a utilização de lípidos com caudas ramificadas, uma vez que vários estudos demonstram que com a utilização destas, o escape endossomal é melhorado quando comparado com a utilização de caudas lineares, devido à protonação mais forte do pH endossomal. Logo, modular o tipo de lípidos e a proporção dos mesmos na formulação lipídica pode também contribuir para o escape endossomal⁶⁸.

Por outro lado, acredita-se que os materiais de origem polimérica rompem os endossomas por ruturas osmóticas. Independentemente da natureza das nanoestruturas e do mecanismo que ocorre, a eficiência do escape endossómico permanece extremamente baixa, o que exige a implementação de novos métodos para aumentar o escape endossómico⁷².

4.3. Vias de Administração para a Entrega das Novas Terapias de RNA

Outro aspeto muito importante na formulação das LNPs é a escolha da via de administração, uma vez que esta pode influenciar a distribuição das mesmas pelos órgãos do organismo, assim como a cinética de expressão e os resultados terapêuticos das formulações de LNPs. A via de administração é frequentemente determinada pelas propriedades das nanopartículas e pelas indicações terapêuticas das mesmas⁵⁵. Após a administração intravenosa, muitas nanopartículas podem acumular-se no fígado, sendo que este é capaz de produzir proteínas secretoras⁶⁶. Desta forma, as nanopartículas podem ser administradas por esta via quando existem proteínas em falta relacionado com distúrbios metabólicos e hematológicos ou mesmo para produzir anticorpos para neutralizar agentes patogénicos ou atingir células cancerígenas. Por outro lado, esta via de administração pode levar à acumulação das LNPs em vários gânglios linfáticos, o que pode aumentar as respostas imunes às vacinas de RNA⁶⁸. A via de administração tópica é também explorada quando o objetivo é alcançar

efeitos terapêuticos locais, sendo que esta via permite a suplementação de proteínas terapêuticas em tecidos específicos como o coração e o cérebro. Esta via pode também estimular respostas sistêmicas, através da injeção intradérmica, intramuscular e subcutânea, uma vez que as APCs presentes na pele e no músculo, podem ser recrutadas e processar antígenos codificados através do RNA, produzindo respostas imunes robustas⁷³. A via intranasal pode também ser utilizada, uma vez que as APCs dos gânglios linfáticos periféricos podem endocitar este tipo de formulações⁵⁴. Por fim, pode ser utilizada também a injeção intratumoral, com o objetivo de estimular um ambiente inflamatório local, e consequentemente a ativação das células do sistema imunitário e a iniciação das respostas anticancerígenas sistêmicas⁶⁸.

5. Aplicação das Novas Terapias de RNA no Tratamento de Doenças Oncológicas

O desenvolvimento de vacinas contra o cancro é o principal foco na investigação em curso relativamente a esta doença. Para conceber uma vacina contra o cancro, é de extrema importância começar pela identificação de antígenos associados ao tumor. Além disso, conhecer o microambiente tumoral que permite a progressão do tumor e o escape ao sistema imunológico do hospedeiro é essencial para conceber o desenho de uma vacina⁴⁷.

As pesquisas atuais sobre o cancro concentram-se em vários tipos de vacinas: (1) vacinas baseadas em antígenos, proteínas associadas a tumores com diferentes sistemas de distribuição, (2) vacinas à base de peptídeos, (3) vacinas celulares baseadas em células dendríticas carregadas com antígenos tumorais, linhas celulares tumorais alogénicas, células cancerígenas autólogas e por fim, (4) vacinas com ácidos nucleicos, incluindo o DNA e o RNA. Considerando as suas vantagens, incluindo eficácia, segurança, tempo e relação custo-eficácia, a estratégia da vacina de mRNA merece atenção, uma vez que esta contra doenças infecciosas já provou os seus benefícios de aplicação, embora ainda esteja em ensaios clínicos para ser aplicada como terapia no cancro, como foi abordado anteriormente⁴⁷.

5.1. Aplicação do circRNA no Tratamento de Doenças Oncológicas

Tendo em conta todas as suas funções, o circRNA participa em vários processos fisiológicos e patológicos, desempenhando um papel importante na patogénese do cancro, uma doença com características individuais³⁶, como instabilidade e mutação do genoma, reprogramação do metabolismo energético, sustentação da sinalização proliferativa, resistência à morte celular, ativação da invasão e metástase, entre muitos outros, sendo que

vários estudos sugerem que o circRNA está envolvido em todos estes processos de desenvolvimento do cancro³⁵.

O circRNA está envolvido na modulação de diferentes respostas do sistema imunitário, em diversos pontos de controlo imunológico, assim como na oncogénese. Esta classe desempenha também a função de biomarcador de diagnóstico e prognóstico de vários tipos de cancro, estando expresso em tecidos tumorais e tecidos normais de forma distinta, com características e em quantidades diferentes³⁵. Para além deste aspeto, também apresenta vantagens relativamente aos biomarcadores clássicos devido à sua sensibilidade e especificidade³⁴. Por fim, é secretado em fluidos corporais, nomeadamente na saliva, urina, sangue e líquido cefalorraquidiano, sendo esta uma grande vantagem na detenção e vigilância do cancro, uma vez que é uma técnica não invasiva e precisa. Vários estudos estão a decorrer para investigar melhor a função desta classe de RNA em estudos de resistência de vários medicamentos³⁵.

Podemos concluir que esta é uma classe de RNA que poderá ser utilizada com diferentes objetivos, devido à vasta gama de funções que apresenta, sendo por isso uma classe muito promissora e com enorme potencial para ser investigada³⁵. No entanto, a função principal em estudo é a utilização do circRNA no tratamento do cancro, uma vez que o este está envolvido na tumorigénese. Vários circRNAs foram identificados como promotores ou supressores de vários tumores, uma vez que influenciam os fenótipos tumorais de várias formas, nomeadamente na angiogénese, proliferação ou crescimento, invasão e metástase³⁹. Um dos exemplos estudado é o ciRS-7 atuando como oncogene, sendo este super-regulado em tecidos de cancro colorretal (CRC), enquanto a superexpressão de ciRS-7 *in vitro* pode induzir um fenótipo maligno⁵⁵. Outro exemplos estudado é o circ-Foxo3, regulado negativamente no cancro de bexiga, em contraste com a sua superexpressão, uma vez que esta poderá induzir a apoptose do cancro de bexiga através da inibição do miR-191, uma família de precursores de microRNA. No entanto, ainda são precisos muitos estudos para conciliar a aplicação da terapia génica com esta estratégia⁷⁴.

Para além da terapia génica, os circRNA podem ser utilizados como vetores terapêuticos devido à sua estabilidade única e capacidade de ligação a miRNA e a proteínas. Desta forma, estes podem ser desenvolvidos com locais de ligação de miRNAs e/ou proteínas, o que pode resultar numa estratégia simples, eficaz e conveniente³⁸. Liu *et al* foram os primeiros a sintetizar circRNA com um local de ligação específico do miR-21 (scRNA21), sendo que depois da transfecção deste tipo de RNA, três tipos de células aumentaram a sua apoptose. Desta forma, o circRNA sintético direcionado a vários miRNAs, proteínas ou combinação de ambos pode prejudicar várias vias oncogénicas. Posteriormente, o mesmo

grupo desenvolveu um circRNA de miR-21 e miR-93, o que levou à inibição significativa da proliferação e migração de células cancerígenas *in vitro* e notável supressão do crescimento tumoral *in vivo*. Este circRNA pode ser administrado através da utilização de exossomas, o que pode melhorar a sua eficácia de direcionamento e aumentar a quantidade de entrega³⁵.

Por fim, e como já abordado, os tumores podem escapar ao nosso sistema imune inato e adaptativo diminuindo a exposição dos seus antígenos e reduzindo a função das células T efetoras e das células dendríticas, sendo que são infinitas as respostas que precisam de ser respondidas relativamente à heterogeneidade dos tumores. O circRNA pode constituir uma estratégia de imunoterapia antitumoral³⁶. Variados estudos foram realizados para investigar a capacidade do circRNA nesta vertente, nomeadamente a influência do circRNA nas células *Natural Killer* (NK). Com esse objetivo, foi utilizado um plasmídeo específico para a superexpressão de circARSP91, seguindo-se uma análise da resposta das células do carcinoma hepatocelular (CHC) à citotoxicidade provocada pelas células NK. Foi identificada a proteína de ligação ULI6 regulada positivamente (ULBPI) e concluiu-se que esta poderia afetar a ativação das células NK. Por fim, concluíram que o circARSP91 poderia fortalecer a citotoxicidade antitumoral das células NK ao regular positivamente o ULBPI⁷⁵. Existe também uma estreita relação entre o circRNA e o miRNA, sendo este último mais claro e mais estudado. Através de banco de dados, podemos prever um potencial circRNA regulando miRNAs associados à imunidade tumoral e identificar potenciais novos antígenos tumorais.³⁹ Por fim, alguns circRNA contribuem indiretamente para a imunidade antitumoral afetando algumas proteínas, como é o caso do circ-Foxo3 endógeno que poderá provocar a degradação de p53, modulando a resposta imunitária pela formação de um complexo com MDM2. O silenciamento do circ-Foxo3 pode aumentar a viabilidade celular, enquanto a sua superexpressão pode induzir a apoptose celular e suprimir o crescimento tumoral. Desta forma, podemos concluir que estes circRNA podem ser alvos potenciais para terapia antitumoral, no entanto, os mecanismos subjacentes do circRNA permanecem amplamente desconhecidos³⁵.

Muitos são os estudos que indicam o circRNA como uma terapia promissora contra o cancro, no entanto, são muitos os desafios que precisam de ser ultrapassados⁷⁶. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, serão descobertos mais circRNAs como marcadores de diagnóstico e prognóstico, o que poderá orientar a seleção de medicamentos clínicos. Serão formuladas estratégias terapêuticas que dependem do circRNA e que irão proporcionar novas perspectivas e orientações na terapia do cancro. Acredita-se que cada investigação e estudo realizados, aproximam-nos de obter uma abordagem mais adaptada ao doente e com menos efeitos adversos³⁶.

5.2. Aplicação do saRNA no Tratamento de Doenças Oncológicas

A noção de usar saRNAs sintéticos como uma vacina foi descrita pela primeira vez por Zhou *et al.* quando eles modificaram um replicação SFV para expressar a nucleoproteína do vírus Influenza. Alguns anos depois, o mesmo grupo descreveu uma abordagem semelhante com o objetivo de imunizar murganhos contra o vírus Influenza, vírus respiratório sincicial (RSV) ou vírus da doença louping (LIV). Esses estudos demonstraram o potencial das vacinas de saRNA transcritas *in vitro* para induzir respostas imunes protetoras em ratos após injeção intramuscular de RNA não formulado⁴⁶.

Mais de uma década depois, Geall *et al.* descreveram a primeira vacina de saRNA formulada com LNP para RSV e HIV-1. Um lípido catiónico ionizável foi utilizado para encapsular o saRNA, o que conferiu proteção contra a degradação da RNase e, após a injeção intramuscular, aumentou a imunogenicidade, quando comparado ao saRNA não formulado. A imunidade protetora profilática foi alcançada, o que foi equivalente e comparável aos títulos neutralizantes necessários para proteger os indivíduos da infecção⁵⁴.

Desta forma, podemos perceber que as terapêuticas com saRNA têm sido investigadas para diversas áreas terapêuticas, nomeadamente contra o SARS-CoV-2, o vírus Influenza, vírus da raiva e o HIV-1⁹. O desenvolvimento e a otimização destas novas terapias como ferramenta terapêutica para o tratamento do cancro é também muito promissora, nomeadamente no melanoma e no cancro do cólon⁹.

Apesar da tecnologia do saRNA ainda não ter sido aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), os seus resultados promissores nos ensaios clínicos e as características superiores que apresenta relativamente ao mRNA, dão origem a uma nova era na vacinologia. Desta forma, o uso de vacinas com saRNA contra o cancro pode alcançar uma expressão robusta de antígenos num curto período⁴⁷. O saRNA pode ser concebido para expressar antígenos associados ao tumor, fatores imunoestimuladores ou outras proteínas terapêuticas para atingir diretamente as células cancerígenas ou modular a resposta imunitária contra o cancro²¹. Desta forma, o alvo do antígeno pode ser um fator tumoral geral, como o antígeno carcinoembrionário, ou uma proteína específica do tumor, como os antígenos E6 e E7 do papilomavírus humano⁷⁷. Esta versatilidade permite que o saRNA seja adaptado a vários tipos de cancro individuais ou a características específicas do doente, contribuindo para o campo emergente da medicina personalizada.

Após a injeção de saRNA, os antígenos desejados são traduzidos e apresentados ao MHC I e II, o qual irá induzir uma resposta imune celular e humoral, através da ativação das

células T específicas do tumor e da estimulação das células B, resultando no controle do crescimento e na regressão tumoral⁷⁸. Estudos demonstram a indução de respostas imunitárias potentes, inibição do crescimento tumoral e aumento das taxas de sobrevivência em modelos animais. Estão a decorrer ensaios clínicos para avaliar a segurança, a tolerabilidade e a eficácia das terapias baseadas no saRNA em doentes humanos. Estes ensaios visam avaliar a capacidade do saRNA para induzir respostas imunitárias antitumorais e o seu potencial como terapia autónoma ou em combinação com outras modalidades de tratamento⁷⁹. Por outro lado, os resultados clínicos apoiam estudos adicionais para melhorar e desenvolver novas estratégias de entrega, nomeadamente uma injeção intratumoral de saRNA encapsulado com LNPs, sendo que esta é uma tecnologia em constante avanço⁸⁰.

5.3. Panorama Atual no Mundo da Investigação: Ensaios Pré-clínicos e Clínicos

O campo da vacinologia de RNA está em constante evolução à medida que novos estudos visam melhorar a transcrição *in vitro*, otimizar formulações com a utilização de adjuvantes, melhorar os veículos de entrega e, finalmente, refinar a farmacocinética *in vivo*. No entanto, com uma variação tão grande nas abordagens de vacinação e poucas comparações paralelas, é difícil decifrar quais serão as estratégias melhores⁴⁶.

Até ao momento, não houve relatos pré-clínicos onde apenas o circRNA tenha sido usado como alvo ou como vetor terapêutico para o tratamento do cancro, mas esse cenário poderá mudar no futuro³⁶. Existem apenas alguns ensaios clínicos onde a circRNA é utilizado para explorar as outras funções deste RNA, nomeadamente como biomarcador⁴⁰. Ao projetar a terapêutica com circRNA, existem algumas questões importantes a serem consideradas. O direcionamento de circRNAs oncogénicos deve ser preferencialmente realizado de uma maneira que não interfira na expressão linear do mRNA. Uma rota terapêutica viável pode ser interferir com o *splicing* reverso introduzindo oligonucleotídeos antisense complementares aos sinais de *splicing* reverso no pré-mRNA. No futuro, também poderemos ver aplicações para circRNAs pré-formados independente de *splicing* nuclear e exportação. No entanto, deve haver especial atenção para não induzir uma resposta de interferência pela introdução de circRNA estranho. Para qualquer uma das estratégias mencionadas acima, um grande desafio será atingir a maioria das células malignas para evitar a recorrência do cancro³⁶.

Por outro lado, existem vários ensaios pré-clínicos e clínicos relativos ao saRNA, onde esta classe de RNA é utilizada em várias indicações clínicas, nomeadamente no tratamento do cancro⁶⁸. A administração intratumoral de saRNA encapsulado com LNPs levou à expressão de níveis elevados de IL-12, resultando num microambiente tumoral altamente inflamado e

iniciando a imunidade antitumoral sistêmica. Em vários modelos animais, uma única injeção intratumoral erradicou grandes tumores e induziu memória imunológica protetora, permitindo uma regressão de tumores distais não injetados⁸¹. Outro ensaio pré-clínico teve como objetivo identificar seis mutações nas proteínas não estruturais. Modelos animais com melanoma foram injetados com LNPs de saRNA, através de uma administração intratumoral. Estudo concluiu que quando o saRNA mutante é entregue às células ocorre um aumento na produção de IL-2 intratumoral, assim como na infiltração de T CD8, resultando num crescimento tumoral mais lento. Estes resultados devem-se ao facto de as mutações presentes no saRNA aumentarem a expressão do gene de interesse⁸² (Tabela 2).

Tabela 2 - Ensaio pré-clínicos *in vivo* com a aplicação do saRNA no tratamento do cancro

Classe de RNA	Tipo de Tumor	Veículo Utilizado	Via de Administração	Referência Bibliográfica
saRNA	Melanoma	LNP	Intratumoral	81
saRNA	Melanoma	LNP	Intratumoral	82
saRNA	Carcinoma do Cólon	LNP	Intratumoral	81

Ensaio clínico realizado para avaliar a atividade antitumoral, a segurança e tolerabilidade em doentes com cancro colorretal com a utilização de uma vacina de saRNA e de outras terapêuticas. Este estudo baseia-se no princípio de que os tumores apresentam mutações únicas nas suas células, sendo que a deteção destas mutações permite a identificação de neoantígenos exclusivos do tumor de cada doente para os mesmos serem incluídos na vacina administrada, originando assim uma terapêutica personalizada⁸³. Outro estudo baseia-se num estudo randomizado de fase II para avaliar a atividade imunológica e antitumoral da vacinação simultânea com VPR-HER2 e pembrolizumab em doentes com cancro da mama com superexpressão de HER2 avançado⁸⁴. Estudo realizado em doentes com cancro colorretal em estadios avançados foram administrados com uma vacina de saRNA encapsulada em VPR. Os resultados foram promissores, uma vez que a sobrevida em 5 anos dos doentes em estadio IV foi de 17%, enquanto os doentes em estadio III apresentaram um sobrevida de 75%⁸⁵ (Tabela 3).

Tabela 3 - Ensaio clínicos da aplicação do saRNA no tratamento do cancro

Classe de RNA	Tumor em Estudo	Veículo Utilizado	Via de Administração	ID Ensaio Clínico	Referência Bibliográfica
saRNA	Colorretal	-----	Intramuscular	NCT05456165	83
saRNA	Mama	VPR	Intravenoso	NCT03632941	84
saRNA	Colorretal	VPR	Intramuscular	NCT01890213	85

É de acrescentar que a *Replicate Bioscience*, juntamente com a *Strand Therapeutics*, a *Kernal Biologics*, a *Orna Therapeutics*, a *Laronde* e a *Circ Bio*, investiram na tecnologia do saRNA e têm planos para desenvolver construções de saRNA para prevenir a resistência aos medicamentos em vários tipos de cancro³³. A *Orbital*, indústria biofarmacêutica fundada por veteranos da *Anylam Pharmaceuticals*, *Beam Therapeutics*, *ARCH Venture Partners* e várias instituições académicas, investiu 270 milhões de dólares nesta tecnologia. Esta start-up visa melhorar a saúde global através do potencial dos medicamentos à base de RNA para tratar doenças humanas de formas anteriormente não possíveis, acreditando no seu futuro promissor³³.

Apesar de ainda não estarem disponíveis ensaios clínicos com a aplicação do taRNA no tratamento de doenças oncológicas, são muitos os estudos que utilizam esta tecnologia para o tratamento de doenças infecciosas. Recentemente, foi desenvolvida uma vacina de taRNA contra o vírus Influenza, utilizando o mRNA não replicante que codifica o gene da replicase e um TR-RNA que expressa a hemaglutinina do vírus Influenza⁴⁵. Com um perfil de segurança favorável, verificou-se que uma baixa dose de RNA (50 ng) era suficiente para induzir anticorpos neutralizantes e desencadear uma resposta imunitária protetora contra o este vírus⁵². Desta forma, evidenciou que o taRNA é capaz de induzir respostas imunes protetoras com menos RNA antigénico, quando comparada à vacina candidata de saRNA. Concluíram que a amplificação do RNA pelas replicases é mais rápida e eficiente com RNAs mais curtos⁴⁵. Por fim, ocorreu um estudo que desenvolveu uma vacina de taRNA contra o vírus Chikungunya (CHIKV), induzindo numa potente resposta imune humoral e celular, o que resultou na proteção de murganhos contra este vírus. Estes dados mostram que o sistema taRNA pode ser usado para gerar vacinas multivalentes, no entanto, serão necessárias otimizações adicionais para aplicação clínica⁵⁸.

6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O progresso das tecnologias de mRNA e dos sistemas de entrega baseados em LNPs permitiu o desenvolvimento de vacinas de mRNA para o COVID-19 numa velocidade sem precedentes, demonstrando o potencial clínico das formulações de LNPs-mRNA. Uma variedade de LNPs foi explorada e otimizada para entrega de mRNA, fornecendo informações valiosas para o futuro *design* da terapêutica de mRNA. O desenvolvimento de LNPs de última geração e outros tipos de materiais de entrega permitirá que terapias baseadas em mRNA possam ser utilizadas para uma ampla gama de doenças e melhorará os cuidados de saúde num

futuro próximo. No entanto, e devido às limitações que apresentou, várias indústrias continuaram a investigar e à procura de novas respostas no mundo do RNA⁶⁴.

O surgimento do saRNA e do taRNA, assim como o circRNA, veio trazer uma nova abordagem e perspectiva relativamente à imunoterapia. Devido às vantagens da regulação positiva do gene usando saRNA, prevê-se que mais medicamentos com saRNA sejam desenvolvidos e transformem a saúde, o tratamento e a medicina dos doentes. Uma maior compreensão da química do saRNA e do seu mecanismo de regulação positiva do gene ajudará a melhorar a seleção de saRNA com mínimo efeito fora do alvo e imunogenicidade com maior potência e estabilidade. Além de usar o saRNA como um agente único, prevê-se que possa ser aplicado posteriormente em diferentes paradigmas de tratamento. Uma possibilidade de otimização é combinar o saRNA com outros medicamentos para melhorar os tratamentos, sendo que este benefício é considerado por muitos investigadores inestimável⁶⁵.

A utilização das terapêuticas com RNA em conjunto com nanomateriais é uma estratégia valiosa para melhorar a eficácia da imunomodulação para tratamentos contra o cancro⁶. Os avanços nos sistemas de entrega visam melhorar a eficiência da entrega de saRNA, a especificidade do alvo e minimizam os potenciais efeitos fora do alvo. Quando usados como parceiros em combinações sinérgicas, serão alcançados resultados mais eficientes e personalizados, permitindo que a combinação concorra com as imunoterapias atuais já existentes no mercado⁶. Desta forma, a nanotecnologia irá fornecer uma breve solução robusta, eficaz, confiável e segura para a deteção e tratamento do cancro. No entanto, embora esta seja uma abordagem bastante promissora para combater o cancro, ainda existem vários obstáculos a serem superados, nomeadamente mais estudos multidisciplinares e abrangentes².

Apesar das descobertas recentes relativas ao saRNA e até à sua otimização, o taRNA, muitos investigadores pensam que o circRNA terá um enorme impacto na forma como se pensa sobre a terapêutica proteica, abrindo desta forma todo um mundo de possibilidades na forma como tratamos doenças e aliviamos o sofrimento humano. Com inúmeras funções em diversos mecanismos celulares, esta é uma classe de RNA que apesar de no seu início não ter suscitado muito interesse e curiosidade, irá certamente ser investigada por muitos³³.

O mundo das terapêuticas de RNA está apenas no início de um longo percurso promissor. Muitos investigadores acreditam que esta será a classe do futuro e que permitirá melhorar o tratamento de inúmeras doenças³³.

Referências Bibliográficas

1. DAILEY, Gabrielle P.; CROSBY, Erika J.; HARTMAN, Zachary C. - Cancer vaccine strategies using self-replicating RNA viral platforms. **Cancer Gene Therapy**. ISSN 1476-5500. 30:6 (2023) 794–802. doi: 10.1038/s41417-022-00499-6.
2. **Nanotechnology: a promising approach for cancer diagnosis, therapeutics and theragnosis - pubmed** - [Consult. 19 ago. 2023]. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36051353/>
3. ZHANG, Ye *et al.* - Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. **Journal of Hematology & Oncology**. ISSN 1756-8722. 12:1 (2019) 137. doi: 10.1186/s13045-019-0833-3.
4. CHEN, Tianshu *et al.* - DNA nanotechnology for cancer diagnosis and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 19:6 (2018) 1671. doi: 10.3390/ijms19061671.
5. SHAMS, Forough *et al.* - Nanotechnology-based products for cancer immunotherapy. **Molecular Biology Reports**. ISSN 1573-4978. 49:2 (2022) 1389–1412. doi: 10.1007/s11033-021-06876-y.
6. **RNA nanotechnology-mediated cancer immunotherapy - pubmed** - [Consult. 19 ago. 2023]. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31903120/>
7. BAYDA, Samer *et al.* - The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules (Basel, Switzerland)**. ISSN 1420-3049. 25:1 (2019) 112. doi: 10.3390/molecules25010112.
8. BOCKAMP, Ernesto *et al.* - Nano-enhanced cancer immunotherapy: immunology encounters nanotechnology. **Cells**. ISSN 2073-4409. 9:9 (2020) 2102. doi: 10.3390/cells9092102.
9. TO, Kenneth K. W.; CHO, William C. S. - An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines. **Expert Opinion on Drug Discovery**. ISSN 1746-0441. 16:11 (2021) 1307–1317. doi: 10.1080/17460441.2021.1935859.
10. LORENTZEN, Cathrine Lund *et al.* - Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. **The Lancet. Oncology**. ISSN 1474-5488. 23:10 (2022) e450–e458. doi: 10.1016/S1470-2045(22)00372-2.
11. FRIEDRICH, Maik; AIGNER, Achim - Therapeutic siRNA: state-of-the-art and future

- perspectives. **Biodrugs**. ISSN 1173-8804. 36:5 (2022) 549–571. doi: 10.1007/s40259-022-00549-3.
12. ZHU, Yiran *et al.* - RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. **Cell Death & Disease**. ISSN 2041-4889. 13:7 (2022) 644. doi: 10.1038/s41419-022-05075-2.
13. IAVARONE, Carlo *et al.* - Mechanism of action of mRNA-based vaccines. **Expert Review of Vaccines**. ISSN 1744-8395. 16:9 (2017) 871–881. doi: 10.1080/14760584.2017.1355245.
14. SOBHANI, Navid *et al.* - Therapeutic cancer vaccines: from biological mechanisms and engineering to ongoing clinical trials. **Cancer Treatment Reviews**. ISSN 0305-7372. 109:2022) 102429. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102429.
15. CASTILLO-HAIR, Sebastian M.; SEELIG, Georg - Machine learning for designing next-generation mRNA therapeutics. **Accounts of Chemical Research**. ISSN 1520-4898. 55:1 (2022) 24–34. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00621.
16. ZHANG, Cuiling *et al.* - Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. **Frontiers in Immunology**. ISSN 1664-3224. 10:2019) 594. doi: 10.3389/fimmu.2019.00594.
17. XU, Shuqin *et al.* - mRNA vaccine era-mechanisms, drug platform and clinical prospection. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 21:18 (2020) 6582. doi: 10.3390/ijms21186582.
18. SUN, Han *et al.* - mRNA-based therapeutics in cancer treatment. **Pharmaceutics**. ISSN 1999-4923. 15:2 (2023) 622. doi: 10.3390/pharmaceutics15020622.
19. XIAO, Yufen *et al.* - Emerging mRNA technologies: delivery strategies and biomedical applications. **Chemical Society Reviews**. ISSN 1460-4744. 51:10 (2022) 3828–3845. doi: 10.1039/d1cs00617g.
20. VISHWESHWARAIAH, Yashavantha L.; DOKHOLYAN, Nikolay V. - mRNA vaccines for cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**. ISSN 1664-3224. 13:2022) 1029069. doi: 10.3389/fimmu.2022.1029069.
21. BLAKNEY, Anna K.; IP, Shell; GEALL, Andrew J. - An update on self-amplifying mRNA vaccine development. **Vaccines**. ISSN 2076-393X. 9:2 (2021) 97. doi: 10.3390/vaccines9020097.
22. LIU, Chuang *et al.* - mRNA-based cancer therapeutics. **Nature Reviews. Cancer**. ISSN 1474-1768. 23:8 (2023) 526–543. doi: 10.1038/s41568-023-00586-2.
23. PATEL, Rikin *et al.* - A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna &

- Johnson & Johnson. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. ISSN 2164-5515. 18:1 ([s.d.]) 2002083. doi: 10.1080/21645515.2021.2002083.
24. LORENTZEN, Cathrine Lund *et al.* - Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. **The Lancet. Oncology**. ISSN 1474-5488. 23:10 (2022) e450–e458. doi: 10.1016/S1470-2045(22)00372-2.
25. SAHIN, Ugur *et al.* - Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. **Nature**. ISSN 1476-4687. 547:7662 (2017) 222–226. doi: 10.1038/nature23003.
26. **mRNA therapeutics in cancer immunotherapy - PMC** - [Consult. 29 ago. 2023]. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8047518/>
27. SAHIN, Ugur *et al.* - An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. **Nature**. ISSN 1476-4687. 585:7823 (2020) 107–112. doi: 10.1038/s41586-020-2537-9.
28. CAFRI, Gal *et al.* - mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. **The Journal of Clinical Investigation**. ISSN 1558-8238. 130:11 (2020) 5976–5988. doi: 10.1172/JCI134915.
29. MODERNATX, INC. - **A phase I, open-label, multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in subjects with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in subjects with unresectable solid tumors**: clinicaltrials.gov, 10 jul. 2023 (Relatório n.NCT03313778). [Consult. 29 ago. 2023]. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03313778>
30. SCORZA, Francesco Berlanda; PARDI, Norbert - New kids on the block: RNA-based Influenza virus vaccines. **Vaccines**. ISSN 2076-393X. 6:2 (2018) 20. doi: 10.3390/vaccines6020020.
31. SZABÓ, Gábor Tamás; MAHINY, Azita Josefine; VLATKOVIC, Irena - COVID-19 mRNA vaccines: platforms and current developments. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**. ISSN 1525-0024. 30:5 (2022) 1850–1868. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.02.016.
32. KLOCZEWIAK, Marek *et al.* - A biopharmaceutical perspective on higher-order structure and thermal stability of mRNA vaccines. **Molecular Pharmaceutics**. ISSN 1543-8392. 19:7 (2022) 2022–2031. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00092.
33. DOLGIN, Elie - Startups set off new wave of mRNA therapeutics. **Nature**

- Biotechnology**. ISSN 1546-1696. 39:9 (2021) 1029–1031. doi: 10.1038/s41587-021-01056-6.
34. ZHANG, Shunhao *et al.* - Circular RNA: a promising new star for the diagnosis and treatment of colorectal cancer. **Cancer Medicine**. ISSN 2045-7634. 10:24 (2021) 8725–8740. doi: 10.1002/cam4.4398.
35. LI, Weizhen *et al.* - Circular RNA in cancer development and immune regulation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. ISSN 1582-4934. 26:6 (2022) 1785–1798. doi: 10.1111/jcmm.16102.
36. KRISTENSEN, L. S. *et al.* - Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field. **Oncogene**. ISSN 1476-5594. 37:5 (2018) 555–565. doi: 10.1038/onc.2017.361.
37. HOU, Xucheng *et al.* - Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**. ISSN 2058-8437. 6:12 (2021) 1078–1094. doi: 10.1038/s41578-021-00358-0.
38. BAI, Yu *et al.* - Research progress on circular RNA vaccines. **Frontiers in Immunology**. ISSN 1664-3224. 13:2022) 1091797. doi: 10.3389/fimmu.2022.1091797.
39. LOAN YOUNG, Tiana *et al.* - Clinical delivery of circular RNA: lessons learned from RNA drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 1872-8294. 197:2023) 114826. doi: 10.1016/j.addr.2023.114826.
40. JAGTAP, Urmila; ANDERSON, Erik S.; SLACK, Frank J. - The emerging value of circular noncoding RNA research in cancer diagnosis and treatment. **Cancer Research**. ISSN 1538-7445. 83:6 (2023) 809–813. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-22-3014.
41. CHEN, Robert *et al.* - Engineering circular RNA for enhanced protein production. **Nature Biotechnology**. ISSN 1546-1696. 41:2 (2023) 262–272. doi: 10.1038/s41587-022-01393-0.
42. AMAYA, Laura *et al.* - Circular RNA vaccine induces potent T cell responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 1091-6490. 120:20 (2023) e2302191120. doi: 10.1073/pnas.2302191120.
43. HUANG, Xiangang *et al.* - The landscape of mRNA nanomedicine. **Nature Medicine**. ISSN 1546-170X. 28:11 (2022) 2273–2287. doi: 10.1038/s41591-022-02061-1.
44. KRÄHLING, Verena *et al.* - Self-amplifying RNA vaccine protects mice against lethal Ebola virus infection. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**. ISSN 1525-0024. 31:2 (2023) 374–386. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.10.011.
45. SCHMIDT, Christin; SCHNIERLE, Barbara S. - Self-Amplifying RNA vaccine candidates: alternative platforms for mRNA vaccine development. **Pathogens (Basel, Switzerland)**.

ISSN 2076-0817. 12:1 (2023) 138. doi: 10.3390/pathogens12010138.

46. BLOOM, Kristie; BERG, Fiona VAN DEN; ARBUTHNOT, Patrick - Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. **Gene Therapy**. ISSN 1476-5462. 28:3 (2021) 117–129. doi: 10.1038/s41434-020-00204-y.

47. PAPUKASHVILI, Dimitri *et al.* - Self-amplifying RNA approach for protein replacement therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 23:21 (2022) 12884. doi: 10.3390/ijms232112884.

48. BLAKNEY, Anna K. *et al.* - Inside out: optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and in vivo delivery of saRNA. **Gene Therapy**. ISSN 1476-5462. 26:9 (2019) 363–372. doi: 10.1038/s41434-019-0095-2.

49. PERKOVIC, Mario *et al.* - A trans-amplifying RNA simplified to essential elements is highly replicative and robustly immunogenic in mice. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. (2023). doi: 10.1016/j.ymthe.2023.01.019.

50. LUNDSTROM, Kenneth - Trans-amplifying RNA: Translational application in gene therapy. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**. ISSN 1525-0024. 31:6 (2023) 1507–1508. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.03.015.

51. BOUAZZAOUI, Abdellatif *et al.* - Strategies for vaccination: conventional vaccine approaches versus new-generation strategies in combination with adjuvants. **Pharmaceutics**. ISSN 1999-4923. 13:2 (2021) 140. doi: 10.3390/pharmaceutics13020140.

52. BEISSERT, Tim *et al.* - A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity. **Molecular Therapy**. ISSN 1525-0016. 28:1 (2020) 119–128. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.09.009.

53. ZHANG, Yuebao *et al.* - Lipids and lipid derivatives for RNA delivery. **Chemical Reviews**. ISSN 1520-6890. 121:20 (2021) 12181–12277. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00244.

54. BLAKNEY, Anna K. *et al.* - Polymeric and lipid nanoparticles for delivery of self-amplifying RNA vaccines. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**. ISSN 1873-4995. 338:2021) 201–210. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.029.

55. LIU, Gary W. *et al.* - Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery to endothelial cells. **Pharmaceutical Research**. ISSN 1573-904X. 40:1 (2023) 3–25. doi: 10.1007/s11095-023-03471-7.

56. JDG, Comes; GP, Pijlman; TAH, Hick - Rise of the RNA machines - self-amplification in mRNA vaccine design. **Trends in biotechnology**. ISSN 1879-3096. (2023). doi:

10.1016/j.tibtech.2023.05.007.

57. GUEVARA, Maria L.; PERSANO, Francesca; PERSANO, Stefano - Advances in lipid nanoparticles for mRNA-based cancer immunotherapy. **Frontiers in Chemistry**. ISSN 2296-2646. 8:2020) 589959. doi: 10.3389/fchem.2020.589959.

58. SCHMIDT, Christin *et al.* - A bivalent trans-amplifying RNA vaccine candidate induces potent chikungunya and ross river virus specific immune responses. **Vaccines**. ISSN 2076-393X. 10:9 (2022) 1374. doi: 10.3390/vaccines10091374.

59. FERDOWS, Bijan Emiliano *et al.* - RNA cancer nanomedicine: nanotechnology-mediated RNA therapy. **Nanoscale**. ISSN 2040-3372. 14:12 (2022) 4448–4455. doi: 10.1039/d1nr06991h.

60. SONG, Wantong; ANSELMO, Aaron C.; HUANG, Leaf - Nanotechnology intervention of the microbiome for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**. ISSN 1748-3395. 14:12 (2019) 1093–1103. doi: 10.1038/s41565-019-0589-5.

61. TREGONING, John S. *et al.* - Formulation, inflammation, and RNA sensing impact the immunogenicity of self-amplifying RNA vaccines. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**. ISSN 2162-2531. 31:2023) 29–42. doi: 10.1016/j.omtn.2022.11.024.

62. SILVA-PILIPICH, Noelia *et al.* - Intratumoral electroporation of a self-amplifying RNA expressing IL-12 induces antitumor effects in mouse models of cancer. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**. ISSN 2162-2531. 29:2022) 387–399. doi: 10.1016/j.omtn.2022.07.020.

63. KAIRUZ, Dylan *et al.* - Production, characterization, and assessment of permanently cationic and ionizable lipid nanoparticles for use in the delivery of self-amplifying RNA vaccines. **Pharmaceutics**. ISSN 1999-4923. 15:4 (2023) 1173. doi: 10.3390/pharmaceutics15041173.

64. WANG, Hong-Li; WANG, Zhi-Gang; LIU, Shu-Lin - Lipid nanoparticles for mRNA delivery to enhance cancer immunotherapy. **Molecules (Basel, Switzerland)**. ISSN 1420-3049. 27:17 (2022) 5607. doi: 10.3390/molecules27175607.

65. KWOK, Albert; RAULF, Nina; HABIB, Nagy - Developing small activating RNA as a therapeutic: current challenges and promises. **Therapeutic Delivery**. ISSN 2041-6008. 10:3 (2019) 151–164. doi: 10.4155/tde-2018-0061.

66. HALD ALBERTSEN, Camilla *et al.* - The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 1872-8294. 188:2022) 114416. doi: 10.1016/j.addr.2022.114416.

67. EYGERIS, Yulia *et al.* - Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. **Accounts of**

- Chemical Research**. ISSN 1520-4898. 55:1 (2022) 2–12. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00544.
68. TENCHOV, Rumiana *et al.* - Lipid nanoparticles—from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement. **ACS nano**. ISSN 1936-086X. 15:11 (2021) 16982–17015. doi: 10.1021/acsnano.1c04996.
69. BLAKNEY, Anna K. *et al.* - The skin you are in design-of-experiments optimization of lipid nanoparticle self-amplifying RNA formulations in human skin explants. **ACS nano**. ISSN 1936-086X. 13:5 (2019) 5920–5930. doi: 10.1021/acsnano.9b01774.
70. LY, Han Han *et al.* - Optimization of lipid nanoparticles for saRNA expression and cellular activation using a design-of-experiment approach. **Molecular Pharmaceutics**. ISSN 1543-8392. 19:6 (2022) 1892–1905. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00032.
71. ABASHKIN, Viktor *et al.* - Silver nanoparticles modified by carbosilane dendrons and PEG as delivery vectors of small interfering RNA. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 24:1 (2023) 840. doi: 10.3390/ijms24010840.
72. KIM, Jeonghwan *et al.* - Self-assembled mRNA vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 1872-8294. 170:2021) 83–112. doi: 10.1016/j.addr.2020.12.014.
73. ANDERLUZZI, Giulia *et al.* - The role of nanoparticle format and route of administration on self-amplifying mRNA vaccine potency. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**. ISSN 1873-4995. 342:2022) 388–399. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.12.008.
74. REN, Longxin *et al.* - Mechanisms of circular RNA degradation. **Communications Biology**. ISSN 2399-3642. 5:1 (2022) 1355. doi: 10.1038/s42003-022-04262-3.
75. NIELSEN, Anne F. *et al.* - Best practice standards for circular RNA research. **Nature Methods**. ISSN 1548-7105. 19:10 (2022) 1208–1220. doi: 10.1038/s41592-022-01487-2.
76. CHEN, Xiaolan *et al.* - Circular RNA in disease: basic properties and biomedical relevance. **WIREs RNA**. ISSN 1757-7012. 13:6 (2022) e1723. doi: 10.1002/wrna.1723.
77. SILVA-PILIPICH, Noelia *et al.* - Local delivery of optimized nanobodies targeting the PD-1/PD-L1 axis with a self-amplifying RNA viral vector induces potent antitumor responses. **Cancer Letters**. ISSN 1872-7980. 561:2023) 216139. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216139.
78. Y, Liu; Y, Li; Q, Hu - Advances in saRNA vaccine research against emerging/re-emerging viruses. **Vaccines**. ISSN 2076-393X. 11:7 (2023). doi: 10.3390/vaccines11071142.
79. PALMER, Christine D. *et al.* - Individualized, heterologous chimpanzee adenovirus and self-

- amplifying mRNA neoantigen vaccine for advanced metastatic solid tumors: phase I trial interim results. **Nature Medicine**. ISSN 1546-170X. 28:8 (2022) 1619–1629. doi: 10.1038/s41591-022-01937-6.
80. CHATURVEDI, Vivek K. *et al.* - Cancer nanotechnology: a new revolution for cancer diagnosis and therapy. **Current Drug Metabolism**. ISSN 1875-5453. 20:6 (2019) 416–429. doi: 10.2174/1389200219666180918111528.
81. LI, Yingzhong *et al.* - Multifunctional oncolytic nanoparticles deliver self-replicating IL-12 RNA to eliminate established tumors and prime systemic immunity. **Nature Cancer**. ISSN 2662-1347. 1:9 (2020) 882–893. doi: 10.1038/s43018-020-0095-6.
82. LI, Yingzhong *et al.* - In vitro evolution of enhanced RNA replicons for immunotherapy. **Scientific Reports**. ISSN 2045-2322. 9:1 (2019) 6932. doi: 10.1038/s41598-019-43422-0.
83. **Study Record | ClinicalTrials.gov** - [Consult. 24 ago. 2023]. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05456165?cond=cancer&term=self-amplifying&rank=1>
84. **Study Record | ClinicalTrials.gov** - [Consult. 24 ago. 2023]. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03632941?cond=cancer&term=self-amplifying&rank=2>
85. CROSBY, Erika J. *et al.* - Long-term survival of patients with stage III colon cancer treated with VRP-CEA(6D), an alphavirus vector that increases the CD8⁺ effector memory T cell to Treg ratio. **Journal for Immunotherapy of Cancer**. ISSN 2051-1426. 8:2 (2020) e001662. doi: 10.1136/jitc-2020-001662.